

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

**Papel de la señalización BMP4 en la diferenciación y funcionalidad de
las células NK tímicas y periféricas humanas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Hidalgo Lumbreras

Directores

Ángeles Vicente López

Alberto Varas Fajardo

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGÍA 1

Papel de la señalización **BMP4**
en la diferenciación y funcionalidad de
las **células NK** tímicas y periféricas
humanas.

TESIS DOCTORAL
LAURA HIDALGO LUMBRERAS
2014

DEPARTAMENTO BIOLOGÍA CELULAR

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



Papel de la señalización BMP4 en la diferenciación y funcionalidad de las células NK tímicas y periféricas humanas

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular

Laura Hidalgo Lumbreras

Dña. Ángeles Vicente López, Catedrática de Universidad

Departamento de Biología Celular

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

y

D. Alberto Varas Fajardo, Profesor Titular de Universidad

Departamento de Biología Celular

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Certifican que Dña. Laura Hidalgo Lumbreras, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, el trabajo titulado: "Papel de la señalización BMP4 en la diferenciación y funcionalidad de las células NK tímicas y periféricas humanas", considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Inmunología.

VºBº de los DIRECTORES

El interesado

Fdo. Ángeles Vicente López

Fdo. Alberto Varas Fajardo

Fdo. Laura Hidalgo Lumbreras

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



**Papel de la señalización BMP4 en la diferenciación y
funcionalidad de las células NK tímicas y periféricas humanas**

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular

TESIS DOCTORAL

Laura Hidalgo Lumbreras

2014

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos “*Relevancia funcional de diferentes poblaciones de células NK humanas. Efectos antitumorales y papel de la señalización BMP2/4*” (SAF2012-33180) e “*Implicación de la ruta de señalización BMP2/4 en la biología de las células NK humanas. BMPRIA como nuevo marcador de la diferenciación y funcionalidad de estas células*” (BFU2009-10315/BMC) y bajo el programa de Formación de Profesorado Universitario (AP2009-4324), Ministerio de Educación, Cultura y Deportes.

ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2'-Azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6] sulfónico
ActRIA	receptor tipo I de Activina, del inglés <i>Activin A receptor type I</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario total
ALK	receptor tipo I de Activina, del inglés <i>activin receptor-like kinase</i>
ARN	ácido ribonucleico
BCR	receptor de células B, del inglés <i>B cell receptor</i>
BMP	proteína morfogenética ósea, del inglés <i>bone morphogenetic protein</i>
BMPRIA	receptor tipo IA de BMP, del inglés <i>BMP receptor type IA</i>
BMPRIB	receptor tipo IB de BMP, del inglés <i>BMP receptor type IB</i>
BMPRII	receptor tipo II de BMP, del inglés <i>BMP receptor type II</i>
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BR-Smad	Smad regulada por receptor específica de BMP, del inglés <i>BMP-specific receptor-regulated Smad</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCL	quimioquina CC, del inglés <i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	receptor de quimioquina CC, del inglés <i>chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD4ISP	CD4 inmaduro simple positivo
CLP	progenitor linfoide común, del inglés <i>common lymphoid progenitor</i>
CMV	<i>citomegalovirus</i>
Co-Smad	Smad común, del inglés <i>common-mediator Smad</i>
CXCL	quimioquina CXC, del inglés <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	receptor de quimioquina CXC, del inglés <i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DC	célula dendrítica, del inglés <i>dendritic cell</i>
DM	dorsomorfina
DMH1	Homólogo 1 de dorsomorfina
DN	doble negativo
DP	doble positivo
E-	fracción enriquecida
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ETP	precursor tímico temprano, del inglés <i>early lymphoid progenitors</i>
FLT3L	<i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
GDF	factor de crecimiento y diferenciación, del inglés <i>growth/differentiation factor</i>
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GvL	injerto contra leucemia, del inglés <i>graft versus leukemia</i>
HCl	ácido clorhídrico
HCMV	<i>citomegalovirus</i> humano, del inglés <i>Human cytomegalovirus</i>
HLA	antígenos leucocitarios humanos del inglés <i>human leukocyte antigen</i>
HSC	células madre hematopoyéticas, del inglés <i>hematopoietic stem cell</i>
HSCT	trasplante de células madre hematopoyéticas, del inglés <i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
hu/moFTOC	cultivos organotípicos quiméricos humano-ratón, del inglés <i>fetal thymus organ culture</i>
iDC	DC inmadura
IDO	indol 2,3-dioxigenasa, del inglés <i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
Ig	inmunoglobulina
IL	interleuquina
ILC	células linfoides innatas del inglés <i>Innate lymphoid cell</i>

INF γ	Interferón gamma
iNOS	óxido nítrico sintasa, del inglés <i>Nitric oxide synthase</i>
IP	ioduro de propidio
IP-10	<i>interferon gamma-induced protein 10</i>
I-Smad	Smad inhibidora, del inglés <i>inhibitory Smads</i>
ITAM	motivo de activación en inmunoreceptor basado en tirosina, del inglés <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	motivo de inhibición en inmunoreceptor basado en tirosina, del inglés <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
KIR	receptor tipo inmunoglobulina, del inglés <i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
LAMP-1	proteína de membrana asociada a lisosomas-1, del inglés <i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LDH	lactato deshidrogenasa
MALT	tejido linfóide asociado a mucosas, del inglés <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MCP	proteína quimioatrayente de monocitos, del inglés <i>monocyte chemotactic protein</i>
MDSC	células supresoras derivadas de mieloides, del inglés <i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad del inglés <i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I chain-related</i>
MIP	proteína inflamatoria de macrófagos, del inglés <i>macrophage inflammatory protein</i>
MoDC	DC derivada de monocitos, del inglés <i>monocyte-derived DC</i>
NaCl	Cloruro de sodio
NCR	receptores de citotoxicidad natural, del inglés <i>natural cytotoxicity receptors</i>
NK	célula asesina natural del inglés <i>natural killer</i>
NK _{imm}	NK inmaduras
NK _m	NK maduras
OP	proteína osteogénica, del inglés <i>osteogenic protein</i>
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PCR _q	PCR cuantitativa a tiempo real
PD-L	ligando de muerte celular programada, del inglés <i>programmed death-ligand</i>
PGE ₂	prostaglandina E ₂ , del inglés <i>prostaglandin E2</i>
pSmad	Smad fosforilada
RAG	genes activadores de la recombinación, del inglés <i>recombination activating gene</i>
RANTES	<i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
R-Smad	Smad reguladas por receptor, del inglés <i>receptor-regulated Smad</i>
RTE	recientes emigrantes tímicos, del inglés <i>recent thymus emigrant</i>
RT-PCR	PCR punto final
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCID (ratones)	ratones inmunodeficientes, del inglés <i>severe combined immunodeficient</i>
SFB	Suero fetal bovino
SHP	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
SP	simple positivo
TAM	macrófagos asociados al tumor, del inglés <i>tumor-associated macrophages</i>
TCR	receptor de células T, del inglés <i>T cell receptor</i>
TEC	células epiteliales tímicas, del inglés <i>thymic epithelial cells</i>
TGF β	factor de crecimiento transformante beta, del inglés <i>transforming growth factor beta</i>
TLR	receptor tipo toll, del inglés <i>toll-like receptor</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés <i>tumor necrosis factor alfa</i>

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	células T reguladoras
ULBP	proteína de unión a UL-16, del inglés <i>UL16-binding protein</i>
XCL	quimioquina C , del inglés <i>chemokine (C motif) ligand</i>
XCR	receptor de proteína C, del inglés <i>chemokine (C- motif) receptor</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
1. CÉLULAS NK	7
1.1 Receptores de las células NK	8
1.1.1 Receptores inhibidores	8
1.1.2 Receptores activadores	9
1.2 Diferenciación de las células NK	11
1.3 Factores que influyen en la diferenciación de las células NK	15
1.4 Otras localizaciones anatómicas donde tiene lugar la diferenciación de células NK	16
1.5 Funcionalidad de las células NK	17
1.5.1 Papel antitumoral	18
1.5.2 Papel en infecciones	18
1.5.3 Papel como células reguladoras	19
1.5.4 Terapia con células NK	20
1.6 El timo y las células NK	22
2. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS	26
2.1 Componentes de la vía canónica de señalización BMP	26
2.2 Regulación de la señal BMP	28
2.3 Funcionalidad de las BMPs	29
2.3.1 BMP y sistema inmune	30
2.3.2 BMP y linfocitos T	30
2.3.3 BMP y linfocitos B	32
2.3.4 BMP y macrófagos	32
2.3.5 BMP y células dendríticas	32
2.3.6 BMP y células NK	33
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	38
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	38
3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES ENRIQUECIDAS EN DIFERENTES POBLACIONES CELULARES TÍMICAS	38
4. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES A PARTIR DE MUESTRAS DE GANGLIOS LINFÁTICOS	39
5. AISLAMIENTO DE PRECURSORES TÍMICOS	39

6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK TÍMICAS	40
7. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA	41
8. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN	42
8.1 Cultivos orgánicos de lóbulos tímicos fetales (FTOC) quiméricos humano-ratón	42
8.2 Generación de células NK a partir de progenitores tímicos	42
9. ENSAYOS DE ACTIVACIÓN	43
10. GENERACIÓN MoDCs. CO-CULTIVOS CÉLULAS NK-DCs	43
11. DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA	44
12. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	44
13. DETERMINACIÓN DE FACTORES SOLUBLES EN SOBRENADANTES	45
14. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	45
15. CITOMETRÍA DE FLUJO	46
16. INMUNOFLUORESCENCIA	47
17. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	48
18. ANÁLISIS POR RT-PCR PUNTO FINAL	48
19. ANÁLISIS POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (PCRq)	49
20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
RESULTADOS	51
1. PAPEL DE BMP4 EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS NK EN TIMO HUMANO	52
1.1 Precursores tímicos humanos expresan componentes de la vía canónica de señalización BMP.	52
1.2 BMP4 bloquea la diferenciación de precursores CD34⁺ intratímicos hacia el linaje T	52
1.3 Progenitores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ presentan características típicas de progenitores de células NK	53
1.4 Los precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ diferencian principalmente a células NK	55
1.5 La diferenciación de las células NK intratímicas ocurre a través de un estadio intermedio BMPRIA⁺	58
1.6 Papel de la señalización BMP en la diferenciación de las células NK intratímicas	60
1.6.1 BMP4 se produce de manera autocrina durante la diferenciación de las células NK generadas a partir de precursores tímicos	60
1.6.2 El bloqueo de la señalización BMP inhibe la diferenciación de las células NK intratímicas	61
1.6.3 BMP4 regula la proliferación y la supervivencia durante la generación de las células NK intratímicas	62

1.6.4 BMP4 es necesario para la adquisición de las propiedades funcionales de las células NK	63
1.7 BMP4 e IL-15 cooperan en la diferenciación de las células NK intratímicas	64
1.7.1 IL-15 promueve la señalización BMP durante la diferenciación de células NK intratímicas	64
1.7.2 BMP4 actúa en estadios tempranos de la diferenciación de NK intratímicas	65
2. ESTADIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES DE LA DIFERENCIACIÓN INTRATÍMICA DE CÉLULAS NK	68
2.1 Las células NK intratímicas se localizan principalmente en el compartimento medular	68
2.2 Distintos estadios de diferenciación de las células NK están presentes en el timo humano	69
2.3 Estadios intermedios de diferenciación de células NK presentes en timo y en ganglios linfáticos son sensibles a BMP4	70
2.4 Las células NK intratímicas podrían constituir una población de células residentes de tejido	73
2.5 Las células NK intratímicas presentan características diferentes de las células NK de sangre periférica	74
2.6 Las células NK intratímicas expresan basalmente bajos niveles de granzima y perforina	77
2.7 Tras activación, las células NK intratímicas producen diferentes citoquinas y quimioquinas	78
2.8 Las células NK tímicas presentan una capacidad citotóxica reducida tras estimulación con IL-12 e IL-15	81
2.9 Las células NK intratímicas expresan receptores tipo Toll (TLRs) y son capaces de responder a este tipo de estimulación	83
3. PAPEL DE BMP EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA	86
3.1 Las células NK de sangre periférica expresan tanto receptores como ligandos BMP	86
3.2 Las células NK periféricas modulan tras activación componentes de la vía de señalización BMP	87
3.3 La ruta de señalización BMP está activa en las células NK activadas	88
3.4 DMH1 bloquea la fosforilación de las proteínas BR-Smad	89
3.5 El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP reduce la proliferación de las células NK sin afectar su viabilidad	89

3.6 La señalización BMP es necesaria para la completa funcionalidad de las células NK	91
3.6.1 El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP disminuye en las células NK activadas su capacidad de producción de citoquinas y quimioquinas	91
3.6.2 El bloqueo de la ruta de señalización BMP durante la activación de las células NK reduce drásticamente su actividad citolítica	93
3.6.3 El bloqueo de la vía de señalización BMP inhibe la maduración de MoDCs inducida por las células NK	94
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFÍA	116
SUMMARY	136
Introduction	137
Objective	138
Methods	138
Results and discussion	139
Conclusions	141
References	142
ANEXO	145

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS NK

En la década de 1970, diferentes laboratorios describieron, de manera independiente, una actividad citotóxica espontánea antitumoral en el bazo de ratones no manipulados y en la sangre periférica de individuos humanos sanos. Las células responsables de esta actividad fueron posteriormente identificadas y denominadas *natural killer* (NK) *cells* o células asesinas naturales¹⁻⁶. Esta subpoblación de linfocitos se distinguía de las subpoblaciones de células T y de células B debido a la ausencia del reordenamiento de genes específicos para el reconocimiento de antígeno, por lo que fueron clasificadas en el sistema inmune innato^{6,7}. Desde entonces, se han hecho avances muy significativos en el conocimiento de la biología de esta población, y debido a sus propiedades así como a sus características funcionales, atribuidas tanto a la inmunidad innata como a la inmunidad adaptativa, se sitúan en la frontera entre ambos sistemas de defensa⁸.

Actualmente las células NK constituyen un grupo fundamental dentro de las poblaciones conocidas como células linfoides innatas (ILCs), cuya diferenciación es dependiente del factor de transcripción ID2⁹. Entre sus capacidades funcionales se encuentra la protección antimicrobiana y antitumoral así como su capacidad de inmunomodulación a través de la producción de citoquinas y quimioquinas solubles¹⁰.

En humano, son definidas por la expresión de CD56 y por la ausencia del marcador de células T CD3. Representan en torno al 10-15% de los linfocitos de sangre periférica, y pueden ser subdivididas en dos subpoblaciones principales: una minoritaria de células NK CD56^{bright}CD16⁻ con escasa capacidad citotóxica y alta capacidad de producir citocinas, y una mayoritaria que incluye células NK CD56^{low}CD16⁺ con alta capacidad citotóxica y menor capacidad productora de citocinas¹¹⁻¹⁵. Sin embargo, actualmente se sabe que esta división funcional no es tan sencilla puesto que es claramente dependiente del ambiente y del estímulo de activación.

La actividad de las células NK está controlada por un complejo balance entre señales activadoras e inhibidoras desencadenadas por la unión de distintos ligandos con distintos tipos de receptores. El descubrimiento de la existencia de estas señales supuso un gran avance en el entendimiento de la biología y la función de estas células. Actualmente se conoce que las células NK expresan distintos tipos de receptores activadores e inhibidores, capaces de reconocer y unirse a moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) o a ligandos expresados específicamente en las células diana tras infección, transformación

tumoral o señales relacionadas con el estrés celular. La integración de todas esas señales tras interactuar con la célula blanco dictamina la respuesta de las células NK ¹⁵.

1.1 Receptores de las células NK

1.1.1 Receptores inhibidores

En 1990 Ljunggren and Kärre describieron la capacidad de las células NK de lisar células diana que no expresaban MHC y formularon la hipótesis denominada *missing self*, que predecía la existencia de receptores reguladores negativos en las células NK que podrían interactuar con moléculas MHC expresadas en las células sanas y de esta manera evitar la lisis mediada por las células NK ¹⁶. A partir de entonces, se dirigieron muchos esfuerzos hacia la identificación y caracterización de estos receptores inhibidores para MHC.

En humanos, entre los diferentes receptores inhibidores podemos encontrar aquellos pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas KIR, que reconocen antígenos leucocitarios humanos de clase I (HLA-I) HLA-A, -B, -C. Estos receptores constan de varios dominios, siendo el dominio extracelular el que determina la molécula HLA-I que va a reconocer, y el dominio intracitoplásmico el que determina el tipo de señal, activadora o inhibidora, que va a transmitir. De esta forma, los receptores KIR inhibidores poseen motivos ITIM, los cuales tras fosforilación reclutan tirosina-fosfatasas como SHP-1 y SHP-2 que inhiben la activación celular ¹⁷⁻²⁰. Asimismo, NKG2A es un receptor inhibidor heteromérico (CD94/NKG2A) tipo lectina expresado en las células NK ¹⁸ que reconoce la molécula HLA no clásica, HLA-E ^{17,18}. Al igual que los KIR inhibidores, NKG2A contiene un dominio citoplasmático ITIM y es capaz de reclutar SHP-1 ¹⁷ (Figura 1A).

Tanto los receptores KIR como NKG2A son importantes para la diferenciación y la función de las células NK. La expresión de estos receptores es muy heterogénea dentro del conjunto de estas células, con el fin de formar un repertorio de células NK capaces de identificar rápidamente cambios en la expresión de moléculas MHC-I ^{18,21,22}.

Sin embargo, no todos los receptores inhibidores unen moléculas MHC, sino que existen otros receptores entre los que destacan los receptores tipo lectina KLRG1 o CD161, que también poseen un motivo ITIM para la transducción de la señal y que unen cadherinas u otros receptores tipo lectina ¹⁷.

1.1.2 Receptores activadores

Las células NK expresan además una gran diversidad de receptores activadores, que pueden desencadenar tanto el programa citolítico como la secreción de factores solubles²⁰. Algunos de estos receptores activadores inician vías de señalización dependientes de tirosina-quinasa a través de asociaciones no covalentes con proteínas adaptadoras que contienen motivos activadores ITAM^{17,20,23}. De esta forma, receptores KIR activadores, como KIR2DS o KIR3DS, NKp44 o NKG2C se acoplan al adaptador DAP12, mientras que CD16 o los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) NKp46 y NKp30 se asocian con las proteínas FcRγ o CD3ζ^{17,23,24}. La fosforilación de los motivos ITAM conduce al reclutamiento y activación de tirosina-quinazas como Syk o ZAP-70, miembros de la familia Syk^{17,20,23} (Figura 1A).

Adicionalmente, las células NK pueden expresar otros receptores que no están directamente acoplados a motivos ITAM pero que participan en la activación. Éste es el caso de NKG2D, que se asocia de manera no covalente con el adaptador DAP10 que puede señalizar a través de PI3K o Grb-2^{17,20,23}. Existen otros receptores activadores entre los que se incluyen DNAM-1 o los co-receptores de la familia 2B4^{17,20,23}.

Los ligandos celulares de los receptores activadores de las células NK incluyen señales de peligro o de estrés celular expresados *de novo*, así como moléculas expresadas en determinadas células bajo condiciones normales pero que están sobreexpresadas en procesos de infección o de transformación tumoral^{25,26}. De este modo, el receptor NKG2D es capaz de reconocer dos grupos de proteínas, (i) moléculas MHC-I no clásicas como MICA y MICB y (ii) miembros de la familia de proteínas de unión a UL16, ULBP1-6^{18,27}. En cambio, los NCRs, NKp30, NKp44 y NKp46 son capaces de unirse a hemaglutininas u otros ligandos virales, a proteínas asociadas al shock térmico, o a distintos antígenos tumorales¹⁸.

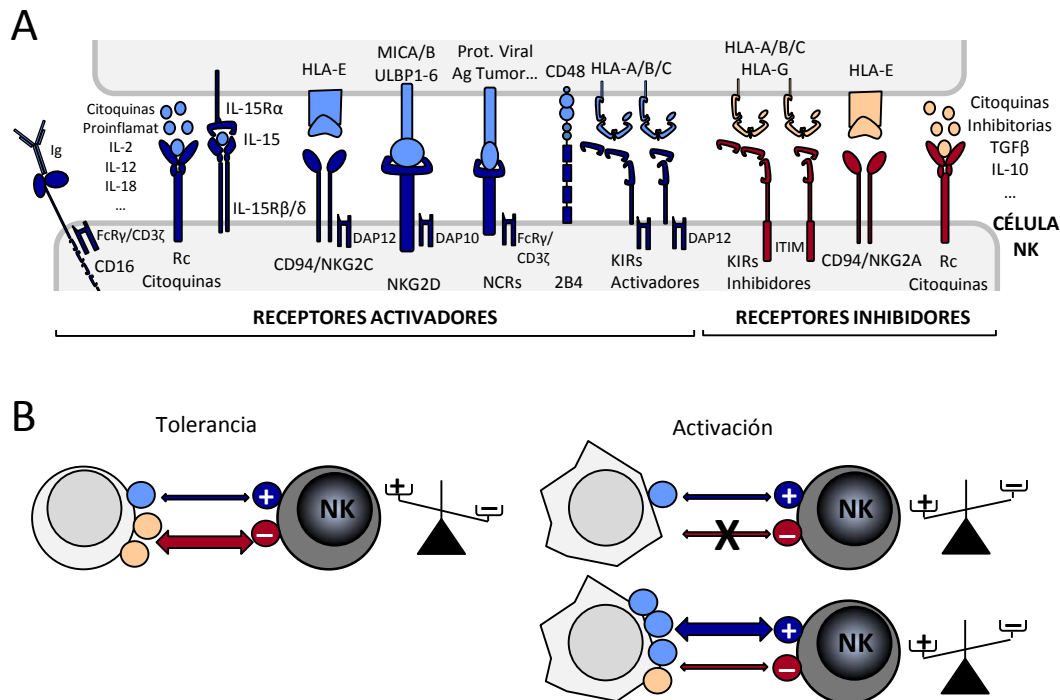


Figura 1. Regulación de la función efectora de las células NK. Representación de diferentes receptores activadores (azul) e inhibidores (rojo) expresados en las células NK y sus respectivos ligandos expresados por las células diana (B) balance entre señales activadoras e inhibidoras que determinan la activación (derecha) o no (izquierda) de las células NK. Los ligandos y receptores activadores están representados en color azul claro y azul oscuro respectivamente, mientras que los ligandos y receptores inhibidores están representados con el color rosa y rojo respectivamente (Modificado de Horowitz et al 2012 (A) y Vivier et al 2011 (B)).

El hecho de que los receptores activadores de las células NK interactúen con sus respectivos ligandos no se traduce directamente en la lisis de las células diana, puesto que estas células blancas pueden estar protegidas por la expresión de moléculas HLA-I específicas que interactúan con los receptores inhibidores de las células NK, siendo éste un importante mecanismo de control para evitar la activación innecesaria de las mismas. Sin embargo, las células infectadas por virus o las células tumorales pueden perder la expresión de moléculas HLA-I e incrementar la expresión de ligandos para los receptores activadores de las células NK, convirtiéndose en células susceptibles a la lisis. Por tanto, es el balance entre las señales activadoras e inhibidoras el que determina la activación o no de las mismas, lo que se traduce en la producción de citoquinas y otros factores, y desencadena la apoptosis de las células blancas^{8,26} (Figura 1B).

Respecto a la producción de factores solubles, las células NK una vez activadas producen fundamentalmente INFγ, pero también producen otras citoquinas, proinflamatorias como TNFα, o inmunosupresoras como IL-10, factores de crecimiento como GM-CSF e IL-3 así como

diferentes quimioquinas como CCL2 (MCP1), CCL3 (MIP1 α), CCL4 (MIP1 β), CCL5 (RANTES), XCL1, o CXCL8 (IL-8) ²⁸.

Por otra parte, las células NK son capaces de inducir la lisis de las células blanco, siendo el principal mecanismo de este proceso la liberación del contenido de los gránulos citotóxicos ^{29,30}. Los gránulos contienen moléculas líticas como las serín-proteasas llamadas granzimas y las granulolisinas ³¹, que alcanzan el citoplasma de la célula diana mediante un mecanismo mediado por la perforina contenida en los mismos ³². Una vez en el interior de la célula, las granzimas y las granulolisinas inducen la apoptosis de estas células activando mecanismos redundantes dependientes e independientes de caspasas ³³. Junto con este mecanismo de reconocimiento de la célula blanco a través de receptores activadores de las células NK, éstas pueden también reconocer a la célula diana a través de otros receptores como CD16, el cual se une a la región constante (Fc) de inmunoglobulinas unidas a la membrana de la célula blanco ³⁴, desencadenando el proceso de apoptosis. Debido al modo de reconocimiento este proceso es conocido como citotoxicidad dependiente de anticuerpos ³⁵. Alternativamente, la apoptosis de la célula blanco también puede ser mediada a través de los denominados receptores de muerte celular, los cuales pertenecen a la familia de receptores de TNF ^{29,30,36}. Entre estos receptores destacan FasL, cuya unión con su ligando Fas juega un papel fundamental en la homeostasis de las células T ²⁹, o TRAIL, que también ejerce una función inmunosupresora e inmunoreguladora ³⁷. La activación de estos receptores induce la apoptosis de las células diana ^{29,30,36}.

1.2 Diferenciación de las células NK

El desarrollo de las células NK ocurre a través de una serie de pasos coordinados de diferenciación y maduración que resultan, respectivamente, en una progresiva restricción hacia el linaje NK y en la adquisición de las competencias funcionales ³⁸.

Las células NK diferencian a partir de células madre hematopoyéticas (HSC) derivadas de la médula ósea, a través de un progenitor linfoide común (CLP) capaz de generar las diferentes subpoblaciones de linfocitos ³⁹⁻⁴¹. Tanto en humano como en ratón se asume que el principal sitio de diferenciación de estas células es la médula ósea, sin embargo, poblaciones similares a estos precursores, así como células NK maduras e intermediarios de diferenciación pueden ser encontradas en sangre periférica y en tejidos extramedulares ⁴²⁻⁴⁶. De esta forma, múltiples evidencias, que serán comentadas posteriormente, apoyan un modelo en el que los intermediarios de diferenciación CD34⁺CD45RA⁺, originados en la médula ósea pueden

movilizarse a tejidos extramedulares donde bajo diferentes ambientes generan subpoblaciones de células NK funcionalmente distintas y específicas de tejido^{10,38,47,48}.

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de la diferenciación de este linaje, lo cierto es que no hay un consenso formal de cómo deben de ser definidos los diferentes estadios de diferenciación. Asimismo, existe una amplia disparidad en los diferentes marcadores que definen las células NK de humano y de ratón^{6,38,49}, lo cual supone una dificultad añadida en el estudio de la diferenciación de esta población.

En humano, sin haberse definido una vía completa de diferenciación en médula ósea, en el año 2006 Freud y col⁴³ identificaron cuatro estadios discretos de diferenciación de células NK en órganos linfoides secundarios basándose en la expresión de CD34, CD117, y CD94: (i) estadio 1 o pro-NK, células CD34⁺CD117⁻CD94⁻, (ii) estadio 2 o pre-NK, células CD34⁺CD117⁺CD94⁻, (iii) estadio 3 o NK inmaduras (NKimm), células CD34⁻CD117⁺CD94⁻ y (iv) estadio 4, células CD34⁻CD117^{+/+}CD94⁺. A medida que estas células diferencian adquieren la expresión de CD56 hasta alcanzar en el estadio 4 un fenotipo CD56^{bright}⁴³.

A partir de este trabajo, Eissens y col⁵⁰ han descrito recientemente una secuencia completa de diferenciación similar en la médula ósea. Basándose en la expresión de CD34, CD117, CD56 y CD94, estos autores establecen siete estadios de diferenciación definidos de la siguiente manera: (i) estadio 1, precursores multipotentes CD34⁺CD117⁻CD56⁻CD94⁻, (ii) la adquisición de CD117 da lugar al estadio 2, CD34⁺CD117⁺CD56⁻CD94⁻; (iii) posteriormente se pierde la expresión de CD34 en el estadio 3a, CD34⁻CD117⁺CD56⁻CD94⁻, con la consecuente restricción del potencial de diferenciación y (iv) el compromiso con el linaje NK a través de la adquisición de CD56 en el estadio 3b, CD34⁻CD117⁺CD56^{dim}CD94⁻. (v) Tras el compromiso con este linaje, continúa su diferenciación hacia células NK inmaduras CD56^{bright}, adquiriendo la expresión de CD94 y alcanzando el estadio 4, CD34⁻CD117⁺CD56^{bright}CD94⁺. (vi) Tras la pérdida de CD117 las células NK adquieren un fenotipo CD56^{dim} en el estadio 5a, CD34⁻CD117⁻CD56^{dim}CD94⁺, (vii) seguido de la pérdida de CD94 en el último estadio definido como 5b, CD34⁻CD117⁻CD56^{dim}CD94⁻⁵⁰ (Figura 2)

En ambos modelos^{43,50}, tanto el estadio 1 como el estadio 2 están formados por células multipotenciales capaces de generar otros linajes celulares como células T o células dendríticas (DCs), teniendo lugar el compromiso con el linaje NK en el estadio 3 de diferenciación. Además, en ambos casos, la adquisición y pérdida de otros marcadores acompaña a la secuencia de diferenciación, de manera similar a lo observado durante la diferenciación *in vitro* en otros sistemas⁵¹. De esta forma, la expresión de marcadores característicos de células

progenitoras como CD34 o CD45RA disminuye a medida que avanza la diferenciación, mientras que se regula de forma positiva la expresión de otros marcadores como CD161 o CD56 que comienzan a expresarse en el estadio 2 y 3 respectivamente, seguidos de la expresión de CD94/NKG2A, NCRs como Nkp46 y Nkp30, o el receptor activador NKG2D en la transición del estadio 3 al 4^{43,50-52} (Figura 2).

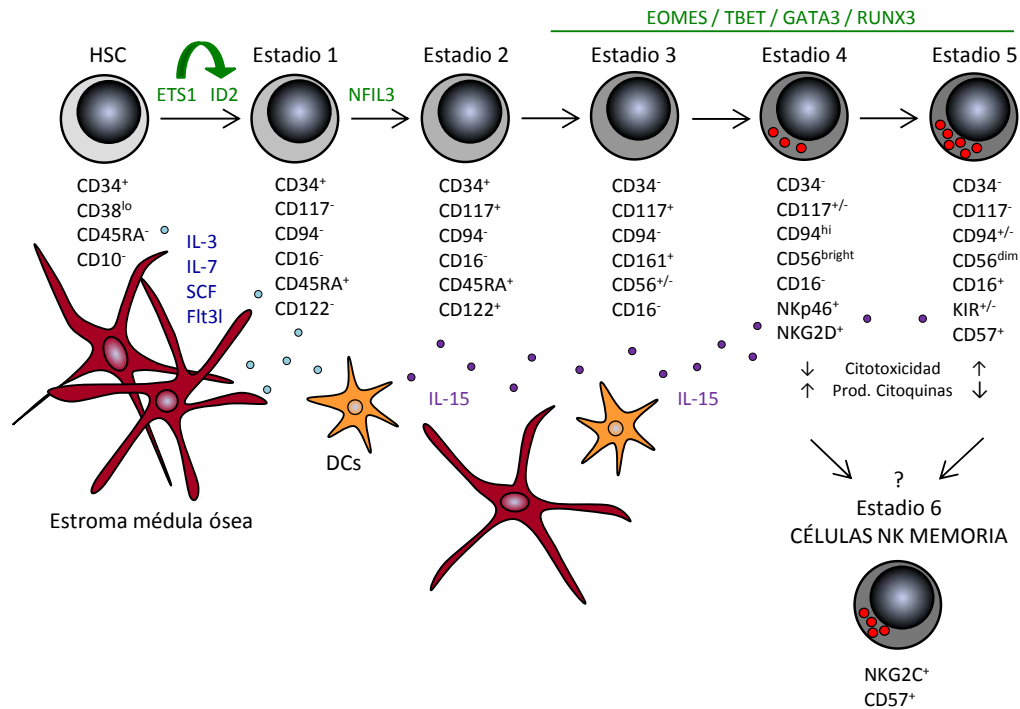


Figura 2. Secuencia de diferenciación de las células NK en médula ósea de humano. Representación esquemática de los diferentes estadios de diferenciación de las células NK en la médula ósea, así como de diferentes factores que participan en la misma (Modificado de Yu et al 2013).

Una diferencia básica que podemos observar entre los dos trabajos es la ausencia del estadio 5 de diferenciación en ganglio linfático⁴³, donde la mayoría de las células que han alcanzado el estadio de diferenciación más avanzado en este órgano presentan un fenotipo CD56^{bright}, siendo equivalentes a la población minoritaria de células NK de sangre periférica. Por el contrario, el estadio 5 de diferenciación formado por células CD56^{dim}, es mayoritario en médula ósea⁵⁰, y se corresponde con la, también mayoritaria, población CD56^{dim} de sangre periférica. Este quinto estadio con un fenotipo maduro de células CD56^{dim} ha sido incluido por Freud y col en revisiones posteriores sobre la diferenciación de este linaje^{10,38}.

La relación de diferenciación entre las células CD56^{bright} y las células CD56^{dim} ha sido objeto de controversia. Muchos estudios apoyan la idea de que las células CD56^{bright} pueden ser precursoras de las células CD56^{dim}^{53,54}, lo cual es coherente con su designación como estadios 4 y 5 de maduración respectivamente. Entre las evidencias a favor se encuentran la

mayor longitud de los telómeros de las células CD56^{bright} ^{55,56}, la prevalencia de esta población en tejidos neonatales y en cordón umbilical, así como su temprana aparición tras el trasplante de células madre hematopoyéticas ⁵⁷ o la ausencia de marcadores de maduración ^{38,47,58-62}.

Por tanto, asumiendo esta idea, encontramos que la mayoría de los datos referentes a este proceso de maduración final de las células NK humanas provienen de los análisis de las células NK de sangre periférica ⁵⁸⁻⁶². Cambios en la expresión de CD94/NKG2A, CD62L, CD16, KIRs o CD57 son utilizados por diferentes grupos para definir la transición de las células CD56^{bright} hacia células CD56^{dim}, con el consecuente cambio de funcionalidad asociado al fenotipo, a través de estadios intermedios de maduración. Aunque la combinación de estos marcadores resulta en una compleja secuencia de poblaciones intermedias, en resumen podríamos definir una población más inmadura CD56^{bright}, CD94/NKG2A⁺, CD62L^{hi}, CD57⁻, CD16⁻, KIR⁻, que daría lugar a una población intermedia CD56^{dim}, CD94/NKG2A⁺, CD62L⁺, CD57⁻ con una pérdida progresiva de expresión de CD94/NKG2A y de la molécula de adhesión CD62L, para terminar generando una población más madura CD56^{dim}, CD94/NKG2A⁻, CD62L⁻, CD57⁺, que adquiriría además durante este proceso los receptores funcionales CD16 y KIR inhibidores y activadores ⁵⁸⁻⁶².

Asimismo, la diferenciación de estas células no sólo conlleva cambios en el fenotipo sino que también se produce la adquisición de las capacidades funcionales, siendo las células NK de los estadios de diferenciación 4 y 5, las únicas capaces de producir IFN γ o de mediar citotoxicidad celular ^{43,50}.

En este sentido, para alcanzar una completa funcionalidad es necesario que las células NK superen, durante la maduración, un proceso clave denominado educación o *licensing* asociado a la expresión de KIRs ^{63,64}. Este evento determina si una célula NK va a ser funcionalmente competente y capaz de reconocer las células propias (educación) o por el contrario, se convertirá en una célula anérgica o débilmente respondedora ⁶³⁻⁶⁷.

Durante este proceso la unión de los receptores inhibidores con sus respectivas moléculas MHC-I propias parece clave, y además parece claro que los receptores activadores también participan en el mismo, aunque son muchas las preguntas que quedan por resolver acerca de este proceso puesto que todavía no se conoce cómo se inicia y quién es el responsable, o cuándo y cómo las vías de señalización activadoras e inhibidoras se ligan funcionalmente durante la educación, y lo que es más importante ¿por qué existen células NK “no educadas” ?

⁶⁵⁻⁶⁷.

Junto con el proceso de educación, otra característica fundamental de las células NK es la memoria, una propiedad atribuida hasta hace pocos años exclusivamente a las células del sistema inmune adquirido. Inicialmente esta característica fue descrita en el modelo de ratón ^{68,69}, pero posteriormente también se observó en humanos ⁷⁰⁻⁷². Actualmente se conocen tres vías a través de las cuales pueden generarse células NK de memoria ⁶⁸: (i) estimulación con citoquinas, (ii) exposición viral, como la infección por citomegalovirus (CMV), y (iii) mediada por haptenos. De todas ellas, la más estudiada ha sido la infección por citomegalovirus humano (HCMV), que induce la expansión y el mantenimiento de una subpoblación de células NK caracterizada por la expresión del receptor activador NKG2C y la expresión mayoritaria de CD57 y KIR ⁷⁰⁻⁷². Esta población se correspondería con las células NK de memoria, previamente descritas en el modelo de ratón ^{68,69}. Tanto en ratón como en humano estas células son capaces de proliferar rápidamente y exhibir un incremento de su capacidad funcional en respuesta a una segunda infección ^{69 70-72}.

Asimismo, estas células NK de memoria son consideradas por algunos autores ^{68,73} como el estadio final de maduración de estas células, siendo la infección por HCMV un ejemplo de cómo determinados ambientes o procesos infecciosos pueden influir en la diferenciación terminal de las células NK. No obstante, al igual que en el proceso de educación son muchas las cuestiones que quedan por aclarar, entre ellas, cómo y a partir de qué población son generadas ^{38,47,73}.

1.3 Factores que influyen en la diferenciación de las células NK

El compromiso de los precursores con el linaje NK y su posterior diferenciación hacia células NK maduras requiere tanto la expresión de factores de transcripción específicos, como la exposición a un ambiente apropiado de citoquinas ⁷⁴.

Diferentes factores de transcripción participan durante la diferenciación y la maduración de las células NK, aunque una secuencia completa de actuación de estos factores todavía no ha sido bien definida ⁷⁵. Entre los factores que han sido implicados en la regulación de la diferenciación de estas células destacan NFIL3 ^{76,77}, ETS1 ⁷⁸ o las proteínas Id, principalmente Id2 e Id3 ⁷⁹⁻⁸¹. Cabe señalar, como ha sido anteriormente mencionado, que la expresión de ID2 es una característica común de todas las poblaciones de ILCs ⁹. Asimismo, recientemente se ha descrito la importancia de NFIL3 en estas poblaciones ⁸². En el caso de las células NK, estos factores de transcripción participan desde etapas tempranas de la diferenciación, y aunque la relación entre ellos es objeto de debate ^{76,78,83,84} parece que la expresión de ID2 es inducida por ETS1 ⁷⁸ así como por NFIL3 ^{76,83}. Posteriormente, éstos y otros factores como TBET, EOMES,

GATA3 o RUNX3, participan en estadios de diferenciación más avanzados, controlando distintos puntos de estas etapas finales como la maduración y la adquisición de las capacidades funcionales^{75,85-87} (Figura 2).

Sin embargo, los requerimientos de estos factores pueden diferir dependiendo del lugar donde diferencian estas células. Así, GATA3 parece ser indispensable para las células NK en el timo de ratón, mientras que no es requerido para la diferenciación en médula ósea⁸⁸. También la expresión de NFIL3 y EOMES varía en función de la localización, puesto que ambos son necesarios en la vía de diferenciación medular, pero no parecen indispensables en las células NK residentes en hígado de ratón con fenotipo TRAIL⁺DX5⁻ o incluso en otras vías extramedulares^{75,89,90}.

Por otro lado, diferentes citoquinas facilitan la generación de las células NK, siendo considerada IL-15 la más importante en la homeostasis de estas células^{91,92 93,94}. El modelo tradicional de diferenciación, implica la existencia de una población de HPCs que no son capaces de responder a IL-15. Gracias a otras citoquinas como IL-3, SCF, IL-7 o FLT3L, esta población de precursores más tempranos da lugar a un intermediario de diferenciación sensible a IL-15^{43,94,95}. De este modo, la adquisición de la capacidad para responder a esta citoquina, supone un paso crucial en la generación de este linaje, puesto que IL-15 desempeña un papel fundamental en la diferenciación de estas células. Asimismo, participa en la proliferación y supervivencia de las células NK maduras^{10,38} (Figura 2).

El receptor de IL-15 está compuesto por tres subunidades, (i) la cadena γ (CD132) común a los receptores para las citoquinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, e IL-21, (ii) la cadena β (CD122) común al receptor para IL-2 y (iii) la cadena α (CD215) específica del receptor para IL-15^{96-98 99}. En cultivos *in vitro*, la administración de IL-15 soluble conduce a la diferenciación de los precursores hacia células NK. Sin embargo, *in vivo*, IL-15 es habitualmente presentada de forma *trans*, unida a CD215^{10,100,101}.

Las células estromales que residen tanto en médula ósea como en otros órganos, son importantes fuentes de estas citoquinas¹⁰²⁻¹⁰⁵. Además, estas células promueven la homeostasis de otros tipos celulares, como DCs, que pueden también facilitar la diferenciación de las células NK mediante la secreción de IL-15 entre otras citoquinas^{38,106}.

1.4 Otras localizaciones anatómicas donde tiene lugar la diferenciación de células NK

Como comentábamos anteriormente, la diferenciación de las células NK puede tener lugar en múltiples localizaciones anatómicas. Aunque precursores capaces de diferenciar hacia

células NK fueron originalmente identificados en médula ósea, experimentos posteriores han revelado la presencia de estos progenitores en ganglio linfático, ya comentado previamente, en sangre periférica, hígado, tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), útero e incluso timo, siendo en todos los casos capaces de diferenciar *in vitro* hacia células NK^{42,43,46,107-109}. Asimismo, la presencia en estos tejidos de células NK maduras apoya fuertemente la idea de que la diferenciación de estas células puede ocurrir, no sólo en médula ósea sino también en diferentes órganos periféricos^{43,107,110,111} (Figura 3).

Queda aún por determinar fehacientemente en qué estadio de diferenciación migran las células desde la médula ósea y si son precursores tempranos, precursores ya comprometidos con el linaje NK o estadios de diferenciación más avanzados o, tal y como sugieren los últimos modelos, una mezcla de todos ellos. Y en relación surge también la pregunta ¿la heterogeneidad periférica se origina por la influencia de las señales específicas del tejido durante la diferenciación de células NK a partir de precursores tempranos o estadios de diferenciación más avanzados que alcanzan el órgano para completar allí su maduración. En este sentido, lejos de ser una población homogénea, las diferentes subpoblaciones de células NK maduras en las diferentes localizaciones muestran una gran diversidad en cuanto a la expresión de CD56 y sobre todo en el perfil de receptores activadores e inhibidores, e igualmente presentan importantes diferencias en cuanto a sus capacidades funcionales que parecen adaptarse a los requerimientos del órgano en el que se encuentran^{38,48,112,113}.

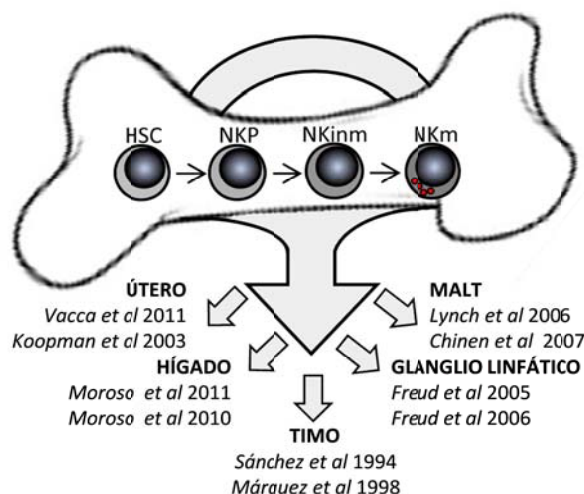


Figura 3. Diferenciación de las células NK en diferentes localizaciones. Precursores e intermediarios de diferenciación, así como células NK maduras salen de la médula ósea y circulan a través del torrente sanguíneo hacia diferentes órganos donde tiene lugar la diferenciación terminal o la adquisición de características fenotípicas y funcionales específicas de tejido. HSC: célula madre hematopoyética; NKP: precursor de células NK; NKinm: célula NK inmadura; NKm: célula NK madura; MALT: tejido linfoide asociado a mucosas.

1.5 Funcionalidad de las células NK

Las observaciones *in vitro* usando células NK de ratón o de humano, los datos *in vivo* en modelos de ratón, así como los datos epidemiológicos en humano, apoyan un papel de las

células NK en el control temprano de infecciones por distintos patógenos y en la respuesta antitumoral. Asimismo, cada vez son más los datos que apoyan que las células NK pueden ejercer, además, un papel inmunoregulador.

1.5.1 Papel antitumoral

Tanto los estudios *in vitro* como *in vivo*, muestran que las células NK son capaces de eliminar células tumorales^{15,26,114}. En ratón, la regresión del tumor es dependiente de la capacidad de las células NK de reconocer células tumorales a través de la pérdida de expresión de moléculas MHC-I, o de la sobre-expresión para ligandos de receptores activadores, especialmente NKG2D y NCRs, señales en ambos casos que hacen que el tumor sea más sensible a la lisis por las células NK¹¹⁵⁻¹¹⁷. Además, la ausencia de células NK en modelos de ratón, ya sea por depleción con anticuerpos o por la deficiencia de las mismas, también sugiere un importante papel de las células NK en el control del desarrollo de tumores¹¹⁶⁻¹¹⁹.

En humano también existen evidencias del papel antitumoral de las células NK. Además de resultados *in vitro*, los datos epidemiológicos de pacientes con cáncer recopilados por Imai y col muestran una asociación entre una baja actividad lítica de las células NK de sangre periférica y un incremento del riesgo a padecer cáncer¹²⁰. Esta asociación ha sido confirmada en diferentes tipos de tumores como adenocarcinoma colorectal hereditario o melanoma^{79,121-123}.

Asimismo, la prueba más convincente del papel antitumoral de las células NK en humano deriva del trasplante alogénico de células madre utilizado como terapia en pacientes con leucemia¹²⁴ y que será posteriormente comentado.

1.5.2 Papel en infecciones

Las células NK proporcionan una protección esencial contra las infecciones producidas por distintos microorganismos, especialmente los virus. En esta respuesta también juegan un papel muy importante receptores activadores como NKG2D o NKG2C. Asimismo, estarían implicados los KIR inhibidores, puesto que en muchos casos se produce una disminución de la expresión de moléculas HLA en las células infectadas, haciéndolas más susceptibles a la lisis^{125,126}.

En humano, la deficiencia de células NK funcionales aumenta la susceptibilidad al desarrollo de infecciones virales, especialmente *influenza o herpesvirus*¹²⁷. En el caso de la infección por *influenza*, las células NK responden rápidamente mediante la secreción de IFN γ ,

así como a través de la actividad citolítica mediada tanto por receptores activadores (NKp46) como por mecanismos dependientes de anticuerpo^{128,129}.

En relación con *herpesvirus*, las células NK participan en el control de la infección por HCMV, de manera similar a lo observado en los modelos de ratón. Durante el curso de la infección por HCMV se produce una expansión de células NK con un fenotipo maduro KIR⁺ que, además expresan el receptor activador CD94/NKG2C^{130,131}. Las células NK a través de NKG2C reconocen células infectadas que han regulado de manera positiva la expresión de HLA-E, ligando de este receptor¹³². Asimismo, se produce una disminución en la expresión de moléculas de HLA-I clásicas, lo cual favorece la pérdida de interacciones inhibitorias¹²⁶. De esta forma, esta población de células NK KIR⁺NKG2C⁺, señalada anteriormente como células NK de memoria, participa en el control de la infección.

Aunque el papel de las células NK ha sido estudiado mayoritariamente en infecciones víricas, cada vez existen más evidencias de la implicación de las células NK en la respuesta inmune frente a determinadas infecciones por bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, hongos como *Cryptococcus neoformans*^{133,134}, o como parásitos como *Plasmodium falciparum*¹³⁵. En general, en respuesta a estos microorganismos las células NK producen INF γ y su activación puede ser regulada a través de factores solubles secretados por otras poblaciones como DCs, monocitos o macrófagos^{136,137}.

1.5.3 Papel como células reguladoras

Además de su papel antiviral y antitumoral, las células NK pueden actuar como células reguladoras influyendo en otros tipos celulares, entre ellos células del sistema inmune como DCs, células T, células B o macrófagos¹⁵. Estas interacciones que se establecen pueden tener diferente resultado en función del contexto en el que se produzcan.

Es especialmente interesante la relación bidireccional que se establece entre las células NK y las distintas poblaciones de DCs, puesto que esta cooperación juega un papel clave en la respuesta inmune contra patógenos y células tumorales^{28,138,139}.

Las DCs inducen la proliferación de las células NK, incrementan su actividad citotóxica y la secreción de citoquinas, principalmente INF γ y TNF, participando de esta manera en la respuesta inmune adaptativa puesto que promueven la polarización de la respuesta Th1 de las células T y la activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs)^{140,141}. Aunque el contacto célula-célula es importante, la activación de las células NK por parte de las DCs se produce principalmente a través de factores solubles como IL-12, IL-18, IFNs tipo I, o IL-15^{138,139}.

Asimismo, las células NK también influyen en la biología de las DCs induciendo bien la maduración o bien la lisis de las DCs inmaduras. En el primer caso, la secreción de IFN γ y TNF tras la activación de las células NK no sólo promueve una respuesta Th1 sino que también influye en la maduración de las DCs. TNF aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y sinergiza con IFN γ , contribuyendo a la producción de IL-12 por las DCs ¹⁴². Igualmente, IFN γ puede también inducir la expresión de IL-15 en membrana, lo cual también favorece la activación y supervivencia de las células NK y de células T ¹⁴³. Además de factores solubles, las células NK pueden mediar la maduración de las DCs a través de receptores activadores como NKp30 ¹⁴⁴.

En el segundo caso, las células NK activadas, en vez de inducir su maduración, pueden lisar DCs inmaduras ¹⁴⁵. El objetivo de la lisis de estas células es prevenir la inducción de tolerancia o una respuesta de primado de las células T inapropiada ^{146,147}. La relación entre el número de células de ambas poblaciones así como una baja expresión de moléculas de MHC-I en las DCs, podrían ser los desencadenantes de este proceso ^{138,139}.

Las células NK pueden también regular la actividad de otras poblaciones del sistema inmune. Aunque la interacción suele ser de manera indirecta, a través de DCs, las células NK pueden actuar también directamente sobre otros tipos celulares como células T, célula B o macrófagos, induciendo la activación o incluso la lisis de estas poblaciones, controlando de esta manera la intensidad de la respuesta ¹⁵ y por tanto participando de manera crucial en la regulación del sistema inmune ¹⁵.

1.5.4 Terapia con células NK

Como hemos visto, las células NK son importantes, si no necesarias, en una variedad de marcos clínicos, especialmente en la erradicación de tumores, lo cual les hace muy atractivas como estrategia terapéutica. Por tanto, actualmente se están desarrollando nuevas terapias cuyo objetivo es aprovechar y estimular la función efectora de estas células. Sin embargo, existen dos problemas principales a los que hay que hacer frente (i) el número de células NK disponible es muy limitado ¹⁸, (ii) las células tumorales, así como los virus, desarrollan mecanismos de evasión de la respuesta inmune que no sólo afectan a las células NK del propio individuo, sino que también afectan a las células NK utilizadas como terapia ^{148 26 149}. Es, por tanto, especialmente llamativa, la limitación de los beneficios clínicos de estas células cuando han sido utilizados como inmunoterapia en el tratamiento de tumores sólidos.

La respuesta inmune frente al tumor puede ser dividida en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. Durante la fase de eliminación, las células transformadas son eliminadas por un sistema inmune competente. En esta fase, como hemos visto anteriormente, juegan un papel clave las células NK. Sin embargo, algunas células tumorales pueden sobrevivir y alcanzar una fase de equilibrio, donde ocurre el proceso de *editing*, en el que las células tumorales evolucionan para evadir el reconocimiento y el control mediado por las células del sistema inmune. De esta forma se alcanza la fase de escape, última fase del proceso, donde los tumores, en un microambiente tumoral inmunosupresor, comienzan a crecer progresivamente y se hacen clínicamente visibles, por lo que es en esta fase cuando comienza la administración de los distintos tratamientos ¹⁵⁰.

En este contexto, la eficacia restringida de las células NK puede deberse a varios factores; como hemos comentado, la persistencia del tumor puede favorecer la selección de células tumorales capaces de evadir la respuesta de las células NK (*editing*) ^{149 148}, bien regulando de manera positiva la expresión de moléculas MHC-I o bien, de manera más general, haciendo solubles los ligandos para receptores activadores convirtiéndose así en células resistentes a la lisis mediada por estas células. Además el microambiente tumoral y el estado de inflamación crónico derivado puede influir negativamente en la funcionalidad de las mismas ¹⁵¹. Este ambiente favorece la diferenciación de diferentes tipos celulares como células T reguladoras (Treg), macrófagos asociados al tumor (TAM), DCs tolerogénicas ¹⁵² o células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) ¹⁵³ que junto con las células tumorales, inhiben la actividad de las células NK a través de la secreción de factores solubles inmunosupresores como TGF β , IL-4, IDO o PGE2 ^{154,155}. Algunos de estos factores, disminuyen la expresión de receptores activadores como NKG2D y NKp46, dificultando el reconocimiento de las células tumorales y disminuyendo tanto la citotoxicidad de las células NK, como la producción de citoquinas o la interacción de estas células con otros tipos celulares ^{148,149,153-155}. Asimismo, el ambiente puede modificar el perfil de quimioquinas que controlan el tráfico de las células NK que infiltran el órgano donde se localiza el tumor e influir de este modo en el reclutamiento de las células NK periféricas, bien del propio individuo o bien las células NK transferidas en el tratamiento ^{26,156,157}.

Con el objetivo de hacer frente a estos problemas actualmente las investigaciones se centran en cómo células NK funcionales pueden ser eficientemente dirigidas y mantenidas en el sitio donde se localiza el tumor. En este sentido, recientemente se ha descrito que en determinados tumores la citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por las células NK puede jugar un papel importante como adyuvante en las terapias basadas en anticuerpos.

Además, a diferencia de la citotoxicidad natural, la citotoxicidad mediada por CD16 puede llevarse a cabo incluso en un determinado ambiente supresor inducido por el tumor^{18,148}.

Además, debido a la disponibilidad limitada de las células NK, son objeto de estudio diferentes estrategias de expansión de esta población. Actualmente, para aumentar la expansión *in vivo* se utilizan bajas dosis de IL-2, pero esta citoquina también conduce a la estimulación de células Treg, cuya activación provoca una inhibición de la funcionalidad de las células NK^{158,159}. Para evitar este problema está siendo testado el uso de otras citoquinas, entre ellas IL-15, que estimula la supervivencia y expansión de las células NK sin provocar la activación de células Treg^{160 18,161,162}.

Sin embargo, a diferencia de los tumores sólidos, las células NK juegan un papel muy importante en la clínica de tumores hematológicos, en concreto en el trasplante haploidéntico de células madre hematopoyéticas (HSCT) como tratamiento para leucemias. Debido a la discordancia de los KIR inhibidores expresados en las células NK que diferencian a partir de las células madre del donante y los ligandos HLA del receptor, las células NK del donante presentan una fuerte aloreactividad que contribuye a la erradicación de las células tumorales, en lo que se conoce como efecto del injerto contra la leucemia (GvL)²⁵.

1.6 El timo y las células NK

Como hemos señalado anteriormente, la diferenciación de las células NK puede tener lugar en diferentes localizaciones, entre ellas la glándula tímica¹⁰⁸. Sin embargo los datos existentes sobre la biología de esta población en timo humano son muy escasos.

El timo es un órgano bilobulado, que a su vez se divide en lobulillos, cada uno de los cuales se organiza histológicamente en un compartimento medular rodeado por un área cortical y un área subcapsular, esta última por debajo de la cápsula conjuntiva. En ambos compartimentos se diferencian dos componentes: el parénquima, constituido por timocitos en diferenciación, y el estroma formado fundamentalmente por una red tridimensional de células epiteliales (TECs)¹⁶³.

Este órgano alberga fundamentalmente la diferenciación de linfocitos T a partir de precursores multipotenciales CD34^{Bright}. Tras el compromiso de estos precursores con el linaje T, se pierde progresivamente la expresión de CD34^{164,165}, mientras que se adquiere la expresión de CD4, alcanzando el estadio CD4 inmaduro simple positivo (CD4ISP)¹⁶⁶. La expresión de CD8α define el siguiente estadio, timocitos CD4⁺CD8⁺ o dobles positivos (DP) inmaduros, que pueden ser subdivididos en dos subpoblaciones en función de la expresión de

CD3, una población DP CD3⁻ que da lugar a otra CD3^{low}, los cuales ya expresan en membrana la cadena β del TCR³⁹. Estas células comienzan a expresar altos niveles de las proteínas RAG, así como pT α , que se combinará con TcR β para permitir la señalización pre-TcR, lo cual precede al comienzo de la expresión de la cadena α del TcR¹⁶⁷. Esta población va a sufrir los procesos de selección positiva/negativa, con el fin de asegurar que discernirá entre lo propio y lo no propio. Finalmente, los timocitos pierden la expresión de CD4 o de CD8, alcanzando el estadio de timocitos SP maduros, CD4⁺ con propiedades reguladoras, o CD8⁺ con propiedades citotóxicas¹⁶⁸.

De esta forma, la diferenciación de los linfocitos T es un programa sumamente ordenado y regulado donde cada paso requiere un microambiente específico, aportado fundamentalmente por las TECs, pero en el cual también participan otros tipos celulares como DCs¹⁶³.

En relación con el contexto de este trabajo, la glándula tímica es considerada en principio un sitio de diferenciación del linaje NK puesto que contiene células NK maduras así como precursores capaces de generar estas células^{165,169,170}. En humano, los pocos estudios presentes en la literatura se han centrado en intentar definir el potencial de diferenciación de las diferentes subpoblaciones de precursores intratímicos. La población más inmadura de precursores de timocitos está incluida dentro de la población DN. En humano, la población DN contiene una población minoritaria de células CD34^{bright}CD33⁺ que retienen el potencial linfomieloide, sugiriendo que esta población representa el precursor más temprano en el timo (ETPs)^{164,169}. La mayoría de trabajos apoyan la idea de un precursor bipotencial T/NK, con un fenotipo CD34⁺CD33⁻CD1a⁻, generado a partir de esta población de ETPs^{165,171-173}. Sin embargo, Marquez y col¹⁶⁴ describen un precursor CD34⁺CD33^{lo}, capaz de diferenciar hacia precursores mieloides CD34⁺CD44^{hi}CD33⁺ con capacidad para generar células NK y DCs. Asimismo, existen otros trabajos que se centran en el estudio de los factores implicados en el compromiso de los precursores intratímicos con el linaje NK, en el cual parecen jugar un papel clave las proteínas Id^{80,81} (Tabla 1). Sin embargo, no existen estudios en relación con la secuencia de diferenciación de las células NK en el timo humano, ni tampoco con las características fenotípicas y funcionales de las mismas.

Al igual que en humano, la mayoría de los datos de las células NK en el timo de ratón se relacionan con el potencial de diferenciación de las distintas subpoblaciones de precursores presentes en el órgano. En este modelo, los ETPs se engloban dentro de la población CD44⁺CD25⁻ o DN1, equivalente a la población CD34^{bright}CD33^{lo} de humano, y a partir de la cual

se pueden generar células NK ¹⁷⁴. Asimismo, han sido descritos precursores bipotenciales T/NK cuyo fenotipo sugiere que estas células están incluidas dentro de la población CD44⁺CD25⁻ o DN2, correspondiente a la población CD34⁺CD33⁻CD1a⁻ descrita en timo humano. Sin embargo, esta población es heterogénea y puede ser subdivida en dos subpoblaciones según la expresión de CD117. De esta forma, el potencial para generar células NK, además de otros linajes, reside en la subpoblación de células DN2 que expresan altos niveles de CD117, denominada DN2a, mientras que las células CD117^{dim} denominadas estadio DN2b ya estarían comprometidas con el linaje T ^{175,176}. Asimismo, las células NK inmaduras podrían derivar no sólo de ETPs vía DN2a, sino también directamente de precursores de células NK (NKP) que colonizan el timo ¹⁷⁶ (Tabla 1).

Como ya hemos mencionado anteriormente, diferentes factores de transcripción estarían involucrados en la diferenciación de las células NK. Klein-Wolterink y col ¹⁷⁶ proponen un modelo para el timo de ratón en el cual los niveles de expresión de BCL11B, factor de transcripción relacionado con la diferenciación de células T, frente a los de NFIL3 pueden ser determinantes para el destino T o NK de las células DN2, puesto que BCL11B y NFIL3, junto con ID2, inhiben mutuamente el linaje NK y T respectivamente ¹⁷⁶.

Además de estos trabajos, se ha descrito que las células NK diferenciadas en el timo de ratón se caracterizan por la expresión de GATA3 y CD127/IL-7 α , siendo IL-7 imprescindible para la homeostasis de esta población (Tabla 1). Asimismo, Vosshenrich y col ⁸⁸, autores de este trabajo, apuntan a que las células NK CD127⁺ presentes en otras localizaciones como ganglios linfáticos derivan del timo, por lo que CD127 sería un marcador para las células NK con un origen intratímico. Igualmente, asumen que las células CD56^{bright} de sangre periférica en humano derivan del timo, puesto que expresan mayoritariamente este marcador. Sin embargo, trabajos posteriores en ratón indican que las células NK CD127⁺ en ganglio linfático se generan de manera independiente a la glándula tímica ¹⁷⁷, no siendo por tanto CD127 un marcador específico de timo. En relación con las células CD56^{bright} de sangre periférica de humano, los datos de otros autores ^{81,178} así como nuestros resultados, tal y como veremos posteriormente, sugieren que estas células no derivan del timo puesto que la expresión de CD127 es minoritaria en las células NK intratímicas.

Por otra parte, Vosshenrich y col ⁸⁸ caracterizan funcionalmente las células NK de timo de ratón, las cuales presentan una menor capacidad citotóxica que las células NK periféricas, pero producen una mayor cantidad de citoquinas como IFN γ , GM-CSF o TNF α , si bien no se conoce su relevancia funcional.

ESPECIE	ESTRATEGIA EXP	RESULTADOS	REFERENCIA
Humano	CD34 ^{bright} ----- T/NKs FTOCs CD34 ^{bright} ----- NK IL-2+IL-7+SCF	Células CD34 ^{bright} de timo fetal contiene una población de progenitores bipotenciales con capacidad para diferenciar hacia células T y NKs	<i>Sanchez et al</i> 1994
	CD34 ⁺ CD33 ^{lo} ----- DCs/NK +IL-7+IL-1 β +IL-6 +GM-CSF+SCF+IL-2	Precusores intratímicos CD34 ⁺ CD33 ^{lo} generan células NK y DCs a través de un precursor intermedio CD34 ⁺ CD44 ^{bright} CD5 ^{lo} /CD33 ⁺	<i>Marquez et al</i> 1998
	CD161+CD34+CD117+ ----- NK IL-2	Timocitos inmaduros CD161+CD34+CD117+ generan células NK	<i>Poggi et al</i> 1996
	Transfección génica mediada por retrovirus de Id3 en precusores tímicos CD34 ⁺ ----- NK FTOCs	La sobreexpresión de Id3 en precusores CD34+ bloquea la diferenciación T y favorece la diferenciación hacia células NK	<i>Heemskerk et al</i> 1997
	Transfección génica mediada por retrovirus de Id2 en precusores tímicos CD34 ⁺ CD1a ⁻ ----- NK FTOCs+IL-15 CD34 ⁺ CD1a ⁻ ----- NK OP-9-DL1+IL-7+FLT3L	La sobreexpresión de Id2 en precusores tímicos bloquea la diferenciación hacia células T mientras que estimula la generación del linaje NK, incrementando un pool de progenitores CD1a ⁻ CD5 ⁺ , que junto con IL-15 diferencian hacia células NK maduras	<i>Schotte et al</i> 2003
Ratón	Precusores DN1 de ratones Rag1 ^{-/-} transferidos a ratones Rag1 ^{-/-} Ly5.1 DN1 ----- NK OP9+IL-15+IL-7+Flt3L+SCF	Células NK funcionales se generan a partir de precusores DN1 intratímicos	<i>Vargas et al</i> 2011
	Diferentes subpoblaciones de precusores DN purificados y cultivados en presencia de la línea OP-9	La población DN2a (CD25+CD44hiCD117+++) es capaz de generar células NK y DCs, pero no la población DN2b (CD25+CD44hiCD117++)	<i>Yui et al</i> 2010
	Ratones WT, Rag2 ^{-/-} y Rag2 ^{-/-} IL-7 ^{-/-} Ratones Rag2 ^{-/-} reconstituidos con WT (Gata3 ^{+/nlslacZ}) o deficientes para GATA-3 (Gata3 ^{nlslacZ/nlslacZ})	La homeostasis de las células NK CD127 ⁺ intratímicas es dependiente de GATA3 y de IL-7. Presentan un fenotipo CD11b ^{lo} CD16 ^{hi} CD69 ^{hi} Ly49 ^{lo} y son capaces de producir considerables cantidades de citoquinas	<i>Vosshenrich et al</i> 2009

Tabla 1. Datos referentes a las células NK en el timo humano y de ratón.

2 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), son factores de crecimiento multifuncionales que forman un subgrupo dentro de la superfamilia TGF β , la cual también incluye las proteínas TGF β , Activinas e Inhibinas, Nodal, Miostatina y la hormona anti-Mulleriana^{179,180}.

Inicialmente fueron identificadas como factores que inducían la formación de hueso y cartílago^{181,182} sin embargo actualmente se sabe que están involucradas en el desarrollo de prácticamente todos los órganos, y en el mantenimiento y renovación de diferentes tejidos adultos¹⁸³.

Hasta la fecha más de 20 miembros ha sido aislados y caracterizados, clasificándose a su vez, en distintos subgrupos según su estructura y sus funciones^{179,184}. Entre ellos destacan:

- Grupo BMP-2/4
- Grupo BMP-3
- Grupo BMP-5/6/7/8 (también denominado proteína osteogénica 1 (OP1))
- Grupo del factor de crecimiento y diferenciación GDF-5/6/7
- Grupo BMP-9/10

Las BMPs son sintetizadas como moléculas precursoras de gran tamaño (400-500aa), las cuales constan de 3 dominios, (i) un péptido señal en la región N-terminal, (ii) un pro-dominio, necesario para el proceso de dimerización, y (iii) un dominio denominado péptido maduro en la región C-terminal. La proteína BMP biológicamente activa es secretada en forma de dímero, generalmente homodímeros, aunque pueden formarse heterodímeros que pueden llegar a ser incluso más efectivos en la activación de la vía de señalización que sus respectivos homodímeros¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

2.1 Componentes de la vía canónica de señalización BMP

Los miembros de la familia BMP señalizan a través de receptores heteroméricos formados por la combinación de dos receptores serín-treonín quinasa tipo I y dos receptores tipo II^{179,180}. Tras la unión del ligando, los receptores tipo II fosforilan a los receptores tipo I que a su vez, reclutan y fosforilan a las proteínas Smad reguladas por receptor específicas de BMP o BR-Smad. Las proteínas BR-Smad, una vez fosforiladas se disocian del receptor y se unen a Smad4, la Smad mediadora común o Co-Smad, formando un complejo que se dirige al núcleo donde regula la transcripción de genes diana a través de la interacción con diversos factores de

transcripción, o el reclutamiento de co-activadores o co-represores transcripcionales específicos^{179,180,188} (Figura 4).

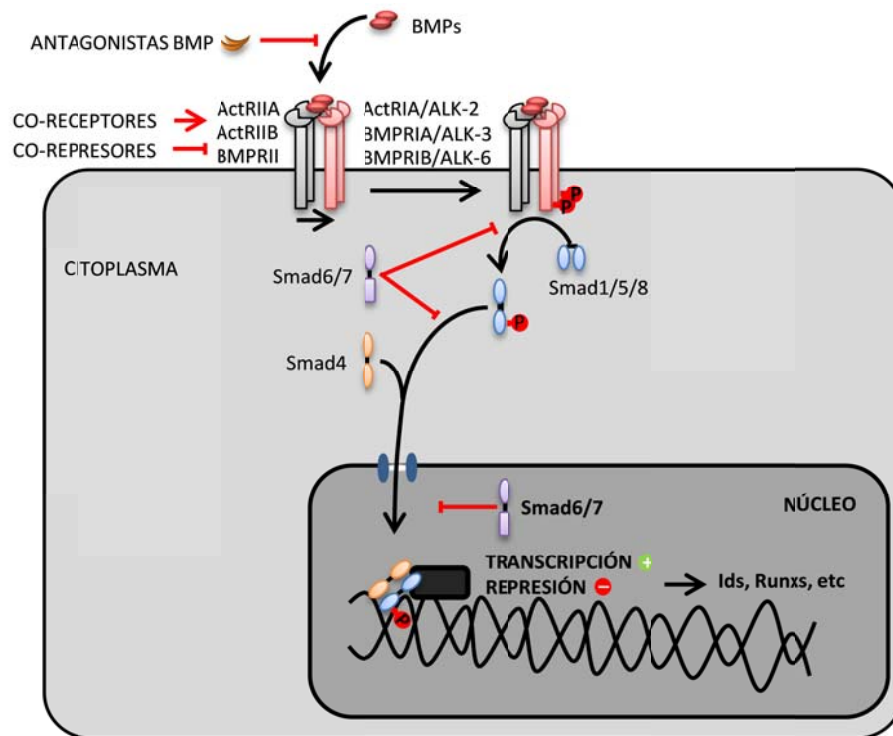


Figura 4. Transducción de la señal BMP. La forma activa de los ligandos BMP se unen a los complejos receptores induciendo la fosforilación de los receptores tipo I a cargo de los receptores tipo II iniciando la ruta canónica de señalización a través de las proteínas Smad. Las BR-Smad (Smad1/5/8) son fosforiladas por los receptores de BMP tipo I y una vez activas forman complejos con la Co-Smad (Smad4) que son translocados al núcleo donde, junto con proteínas accesorias inducen o reprimen la transcripción de genes diana. Las proteínas I-Smad (Smad6/7) regulan negativamente esta vía de señalización mediante diferentes mecanismos.

Tanto los receptores tipo I como tipo II son necesarios para la transducción de la señal. Ambos tipos comparten similitudes estructurales, y están formados por un dominio extracelular relativamente corto, un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática que contiene el dominio serín-treonín quinasa¹⁷⁹.

En cuanto a los receptores tipo I, en mamífero se han identificado siete tipos para la superfamilia TGF β , de los cuales el receptor de Activina tipo IA o ActRIA/ALK2, el receptor de BMP tipo IA o BMPRIA/ALK3 y el receptor de BMP tipo IB o BMPRII/ALK6, son capaces de activar a las proteínas BR-Smad tras unión del ligando BMP. De los tres tipos, BMPRIA es el más conocido y estudiado, y al igual que ActRIA, está ampliamente expresado en diferentes tipos celulares¹⁷⁹. Los receptores BMPRIA/ALK3 y BMPRII/ALK6 son activados fundamentalmente por BMP2 y BMP4, mientras que otros ligandos como BMP6 y BMP7 se unen con mayor afinidad a ActRIA/ALK2 pero débilmente a BMPRII/ALK6¹⁸⁹. Por otro lado, existen tres tipos de

receptores tipo II, de los cuales únicamente BMPRII es específico para ligandos BMP¹⁸⁰ (Figura 4).

En ausencia de la estimulación por el ligando, pequeñas fracciones de los receptores tipo I y tipo II, están presentes como homodímeros y heterodímeros en la superficie celular. La unión del ligando incrementa la oligomerización de los receptores. La actividad quinasa del receptor tipo II está constitutivamente activa y tras la unión del ligando, el receptor quinasa tipo II fosforila al receptor tipo I, lo cual es un evento crítico en la transducción de la señal¹⁷⁹.

La transmisión de esta señal al núcleo está mediada por proteínas de la familia Smad¹⁸⁸. En concreto, las proteínas Smad reguladas por receptor (R-Smad) Smad1, Smad5 y Smad8 son específicas para la señalización BMP (BR-Smad). Las tres proteínas son estructuralmente muy similares y se desconocen sus diferencias funcionales. Están ancladas a la membrana celular, y en ausencia de ligando mantienen una conformación inactiva. Tras activación de los receptores de BMP tipo I, son fosforiladas y sufren cambios conformacionales que permiten la unión con la proteína Smad4. Este complejo, presumiblemente formado por dos proteínas R-Smad y una Co-Smad, se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes diana a través de la unión directa con el ADN, la interacción con otras proteínas de unión al ADN, o por el reclutamiento de co-activadores o co-represores específicos^{179,180,188} (Figura 4).

Entre las dianas de esta vía de señalización destacan las proteínas Id (Id1-4) y los factores de transcripción RUNX (RUNX1-3). Estos genes diana son inducidos en múltiples tipos celulares en respuesta a las proteínas BMP y son factores clave en la regulación de las respuestas biológicas medidas por las mismas¹⁹⁰⁻¹⁹³.

De manera alternativa a la señalización a través de las proteínas Smad, la unión de los ligandos BMP a sus receptores puede activar otras vías de señalización no canónicas en las que están implicadas proteínas MAPKs como p38, JNK y ERK¹⁷⁹.

2.2 Regulación de la señal BMP

Debido a la importancia de la vía de señalización BMP en múltiples procesos, ésta se encuentra sometida a una estricta regulación, tanto a nivel intracelular como a nivel extracelular. Se han identificado un gran número de proteínas extracelulares capaces de unirse a ligandos BMP con alta afinidad e impedir la interacción de dichos ligandos con sus receptores¹⁹⁴. Entre estos antagonistas se encuentran Noggin, Chordin, Twisted gastrulation o miembros de la familia Dan^{187,194}, formando un sistema muy complejo en el que existe un alto grado de

promiscuidad en la interacción de estos antagonistas con los diferentes ligandos BMP¹⁸⁷ (Figura 4).

A nivel de membrana, aunque los receptores tipo I y tipo II son suficientes para la transducción de la señal BMP, la unión del ligando a los receptores y la intensidad de la señal puede ser regulada positivamente por algunos co-receptores, como la familia de proteínas RGM¹⁹⁵ o la proteína endoglina¹⁹⁶. A este nivel existen además otras proteínas capaces de antagonizar la función BMP, como BAMBI, un pseudoreceptor estructuralmente relacionado con los receptores de BMP tipo I. Sin embargo, a diferencia de éstos, carece del característico dominio intracelular. BAMBI, interacciona con los receptores de BMP tipo I y tipo II de manera estable e inhibe la señalización¹⁹⁷. Igualmente, se han descrito algunas proteínas tirosina quinasa transmembrana o serín-treonín quinasa citoplásmicas, capaces de interactuar con los receptores de BMP y regular su función¹⁹⁸⁻²⁰⁰ (Figura 4).

La regulación de la señalización BMP también sucede a nivel intracelular. Existe un tercer grupo de proteínas Smad, formado por Smad6 y Smad7, que son Smad inhibidoras (I-Smad). Smad7 inhibe tanto la señalización TGF β /activina como BMP, mientras que Smad6 preferentemente reprime esta última²⁰¹. Existen diferentes mecanismos de inhibición por parte de estas proteínas, puesto que se ha descrito que pueden interactuar con los receptores tipo I activados²⁰², con Smad1²⁰³, o incluso impedir la formación de complejos ADN-Smad funcionales²⁰⁴. Asimismo, a nivel intracelular la señalización BMP también está restringida por Smurf1 y Smurf2, ubiquitin E3 ligasas que conducen a la degradación de R-Smad vía proteasoma, lo que conlleva la inhibición de señalización BMP^{205,206} (Figura 4).

2.3 Funcionalidad de las BMPs

Como avanzábamos al principio, la función de las BMPs no se limita a la formación de hueso y cartílago sino que presentan un rango de actividades mucho más amplio. Una de las funciones más destacadas e importantes es el papel crítico que juegan en diferentes fases del desarrollo, regulando las primeras etapas de la embriogénesis, la formación de la asimetría derecha-izquierda y del patrón neuronal y esquelético, la formación de las extremidades y la organogénesis. Algunos ligandos BMP son vitales para el desarrollo puesto que ratones deficientes para BMP2 o BMP4, así como para BMPRIA o BMPRII, mueren durante la embriogénesis, mientras que ratones deficientes para BMP7 mueren poco tiempo después del nacimiento²⁰⁷. Pero no sólo son cruciales durante la fase embrionaria y postnatal, sino que en adulto las BMPs son esenciales en la homeostasis de diferentes órganos y sistemas, puesto que

regulan la supervivencia, proliferación, diferenciación y quimiotaxis de distintos tipos celulares, incluidas células del sistema inmune²⁰⁸.

2.3.1 BMP y sistema inmune

Como hemos comentado, las BMPs están implicadas en el mantenimiento y renovación de tejidos adultos, incluidos tejidos linfoides y hematopoyéticos²⁰⁹. Cabe destacar la participación de la señalización BMP en la regulación de la proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos de médula ósea^{210 211 212} (Figura 5).

Además, tal y como veremos a continuación existen numerosos trabajos donde se describe el papel de estas proteínas en etapas más avanzadas de la diferenciación de distintos linajes, así como en la regulación de las actividades funcionales de diferentes poblaciones de células sanguíneas (Figura 5). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los efectos pueden ser diferentes dependiendo del ligando, del tipo celular o incluso de la especie en la cual se realiza el estudio.

2.3.2 BMP y linfocitos T

Existen numerosas evidencias que indican que la señalización BMP juega un papel importante en la regulación de la diferenciación, de la proliferación y en las respuestas efectoras de las células T.

Como ya hemos visto, el timo fundamentalmente alberga el proceso de diferenciación de células T, el cual depende de las señales proporcionadas por el estroma de este órgano. Dentro de estas señales juega un papel importante la señalización BMP, que no sólo participa en la regulación de la diferenciación de estas células sino que además es fundamental para el desarrollo del órgano y el mantenimiento de su estructura^{213,214}.

Los primeros trabajos en el modelo de ratón, incluyendo los de nuestro grupo, describieron la producción de BMP2 y BMP4 por el estroma tímico²¹⁵⁻²¹⁷ y la expresión de los receptores^{217,218} y de la maquinaria necesaria para la transducción de la señal BMP en timocitos DN²¹⁸. De esta forma, la señalización BMP2/4 participa en la regulación de las etapas tempranas de la diferenciación de estas células²¹⁶⁻²¹⁸. Diferentes trabajos en el modelo de ratón indican que los ligandos BMP2 y BMP4 inhiben la proliferación de los timocitos DN, aumentan su supervivencia y bloquean la transición hacia el estadio DP²¹⁶⁻²¹⁸. BMP4 arresta la diferenciación en el estadio DN más temprano, donde los precursores CD44⁺CD25⁻ no están aún comprometidos con el linaje T y pueden dar lugar a células T, B, NK y DCs²¹⁸. Además, la

expresión de los receptores para BMP en todas las poblaciones de timocitos, así como la distribución de los ligandos y determinados antagonistas, tanto en la región cortical como medular, sugiere que la señalización BMP también participa en otros puntos de la diferenciación de las células T ^{216,219,220}.

Posteriormente, resultados similares fueron descritos en el timo humano por nuestro grupo ²²¹. Del mismo modo, que lo encontrado en el timo de ratón, tanto BMP2 como BMP4 son producidos por células epiteliales del estroma tímico y los timocitos expresan toda la maquinaria requerida para responder a estas proteínas. Además, el tratamiento con BMP4 de cultivos organotípicos reconstituidos con precursores CD34⁺ de timo humano, inhibe la diferenciación de timocitos DN hacia el estadio DP, apuntando también un papel de la señalización BMP en la regulación de la diferenciación T en humano ²²¹.

Por otra parte, y en relación con las células T maduras, se ha descrito que la estimulación vía CD3/CD28 de las células CD4⁺ periféricas de ratón provoca un incremento en la expresión de los receptores para BMP. En este contexto, la estimulación con BMP2 y BMP4, así como el bloqueo de la vía de señalización mediante la adición de inhibidor dorsomorfina (DM), modula negativamente la proliferación de las mismas ^{222,223}. Asimismo, la estimulación con BMP6 ejerce un efecto inhibitor sobre la proliferación de la línea celular T Jurkat, aunque no afecta significativamente a la capacidad proliferativa de células CD4⁺ humanas activadas vía PHA o vía CD3/CD28 ²²⁴.

Por otra parte, BMP2 y BMP4 son incapaces de promover por sí mismos la generación de Treg a partir de células CD4⁺CD25⁻ de ratón ²²⁵, aunque la adición de estos ligandos incrementa significativamente la capacidad de TGFβ para promover la generación de iTreg Foxp3⁺ ²²⁵. Asimismo, se ha descrito que la inhibición de la vía de señalización BMP, durante la activación de estas células, bloquea la diferenciación hacia células Treg y Th17, pero no afecta a la diferenciación Th1 y Th2 ²²³.

La vía de señalización BMP también participa en la capacidad de las células T para producir citoquinas, como indican diferentes estudios en el modelo de ratón. Por un lado, el bloqueo de la vía de señalización BMP en las células T CD4⁺ inhibe la producción de IL-2 ²²³ y por otro, BMP4 incrementa la producción de IFNγ por parte de células T CD8⁺ durante la presentación antigénica ²²⁶.

2.3.3 BMP y linfocitos B

La señalización BMP también participa en la generación de las células B. Los datos presentes en la literatura revelan efectos contrarios de los ligandos BMP4 y BMP6 en la diferenciación de linfocitos B a partir de precursores CD10⁺ derivados de médula ósea^{227,228}. De esta forma, mientras que BMP4 promueve la generación de células B²²⁷, BMP6 impide su diferenciación e inhibe la proliferación de los precursores CD10⁺²²⁸.

Por otra parte, la presencia de BMP6 durante la activación *in vitro* de células B tanto vírgenes como de memoria, regula de forma negativa la respuesta inmune humoral, puesto que inhibe su proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas, reduciendo de este modo la producción de Ig^{229,230}. Asimismo, en el modelo de ratón existen evidencias *in vivo* de la función de la vía de señalización BMP en la regulación de la respuesta de los linfocitos B maduros. Así, la deficiencia de Twisted Gastrulation, antagonista soluble de BMP, en linfocitos B provoca, tras la estimulación de estas células vía BCR o TLR4, una respuesta hiperproliferativa, así como una respuesta apoptótica disminuida²³¹.

2.3.4 BMP y macrófagos

La expresión de distintos receptores de la señalización BMP también ha sido descrita en este tipo celular²³². Además, los macrófagos en respuesta a diferentes estímulos son capaces de producir ligandos BMP^{233,234}. La señalización BMP también parece regular la producción de citoquinas por parte de los macrófagos aunque, dependiendo del ligando y la citoquina de estudio, la regulación puede ser positiva o negativa. Así, BMP6 induce la expresión de factores proinflamatorios como iNOS y TNF α , así como IL-1 β e IL-6^{232,235,236}, mientras que la estimulación con BMP4 parece no afectar a la producción de IL-1 β y TNF α pero tiene un efecto negativo sobre la producción de IL-6²³⁷.

Por otra parte, la señalización BMP podría participar en la diferenciación de estas células puesto que estudios a partir de la línea monocítica THP-1 indican que BMP7 favorece la polarización de estas células hacia macrófagos tipo M2²³⁸.

2.3.5 BMP y células dendríticas

Existen pocos trabajos en la literatura sobre la relación de la vía de señalización BMP y las DCs, siendo los más destacados dos trabajos publicados recientemente por nuestro grupo de investigación en los que se pone de manifiesto la implicación de BMP en la biología de estas células^{239,240}. Así, nuestros resultados indican que las DCs inmaduras y maduras derivadas de

monocitos (MoDCs) expresan todos los componentes de la vía de señalización BMP necesarios para responder a la señal. De esta forma, la estimulación de esta vía en las DCs inmaduras induce su supervivencia, así como su maduración ²³⁹. Asimismo, las DCs son capaces de producir BMP4 en respuesta a diferentes estímulos, por lo que esta vía de señalización puede activarse de manera autocrina/paracrina. De hecho, el bloqueo de la señalización BMP durante la maduración de las MoDCs, así como en DCs convencionales, afecta negativamente a la expresión de PD-L1 y PD-L2 y aumenta la capacidad de estas células para estimular tanto células T como células NK ²⁴⁰.

2.3.6 BMP y células NK

Los datos en relación a las células NK son también muy escasos y únicamente se refieren al efecto inhibitorio de otros miembros de la superfamilia TGF β sobre la funcionalidad de estas células ^{241,242}. En este sentido, se ha descrito en humano, el efecto supresor de TGF β en la diferenciación de las células NK ²⁴³ así como en sus funciones efectoras ^{155,242,244}. Asimismo, se ha atribuido un papel inhibitorio sobre la funcionalidad de estas células a otro miembro de la familia TGF β , en concreto Activina-A, la cual ejerce un claro efecto negativo sobre la producción de INF γ por parte de las células NK, y ha sido propuesto como un mediador fundamental en las interacciones funcionales que se establecen entre las células NK y las DCs ^{241,245}.

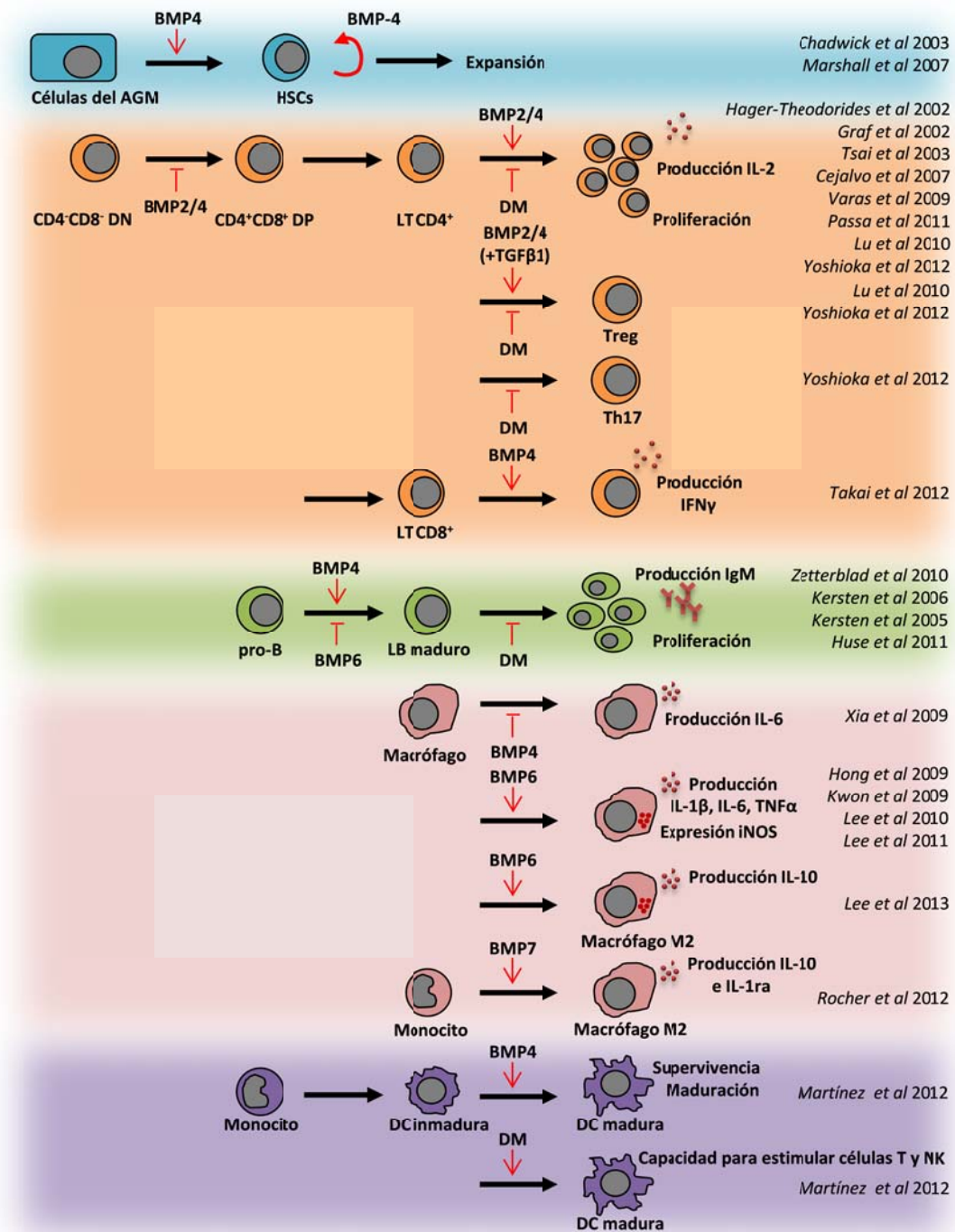


Figura 5. Función de las proteínas BMP en células del sistema inmune. Resumen esquemático de los estudios publicados en relación a la función de los ligandos BMP en diferentes tipos celulares del sistema inmunitario. AGM: aortagonadalmesonefros; HST: célula madre hematopoyética; DN: doble negativo; DP: doble positivo; LT: linfocito T; DM: Dorsomorfina; LB: linfocito B.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Diferentes trabajos en la literatura indican que en el timo humano existen tanto células NK maduras como precursores con capacidad para generar células NK, sin embargo hasta el momento no ha sido descrita una vía de diferenciación completa en este órgano. Tampoco ha sido abordada en profundidad una caracterización fenotípica y funcional completa de las células NK intratímicas, y los pocos resultados existentes hasta el momento han sido obtenidos en el modelo de ratón. Igualmente el papel de la vía de señalización BMP2/4, que nuestro grupo ha descrito implicada en la inhibición de la diferenciación T, también está pendiente de dilucidar en el contexto de la diferenciación de las células NK intratímicas humanas.

Por otra parte, y dado su papel antitumoral y antimicrobiano, las células NK periféricas constituyen una población de interés para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas. Por ello, es interesante analizar el papel de la señalización BMP2/4 en la funcionalidad de las células NK, lo cual no ha sido aún objeto de estudio, ya que podría abrir nuevas vías en la investigación sobre el uso de las células NK en terapia.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo será estudiar el papel de la señalización BMP4 en la diferenciación y funcionalidad de las células NK tímicas y periféricas humanas. Para ello, planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar el papel de la vía de señalización BMP2/4 en la diferenciación de células NK a partir de precursores intratímicos.
2. Establecer diferentes estadios de diferenciación de las células NK en el timo humano así como las características fenotípicas y funcionales de las células NK maduras intratímicas.
3. La expresión de los componentes de la vía canónica de señalización BMP, su funcionalidad, y el efecto del bloqueo de la misma en la biología de las células NK de sangre periférica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

En el presente trabajo se han empleado muestras de timo humano obtenidas de pacientes pediátricos de entre 1 mes y 5 años de edad sometidos a cirugía cardíaca correctora, de acuerdo con el protocolo de la Comisión Ética de los Hospitales 12 de Octubre, Gregorio Marañón y Montepíncipe de Madrid. Asimismo, se han utilizado muestras de ganglios linfáticos mesentéricos obtenidas de donantes multiorgánicos tras obtener los consiguientes consentimientos oportunos y siguiendo los protocolos establecidos por la Unidad de Trasplantes del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Además, se han empleado muestras de buffy coats obtenidos a partir del procesamiento de sangre periférica de donantes sanos en el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para este trabajo se han utilizado ratones inmunodeficientes SCID (C.B17) fetales de 15 días de desarrollo. Los ratones adultos fueron suministrados por Harlan (Harlan Ibérica, Barcelona, España) y mantenidos en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) en un ambiente libre de patógenos. El estudio se inició tras ser aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la UCM.

Las hembras y machos fueron puestos a aparear durante un periodo nocturno, considerándose la mañana siguiente como día 0 de gestación. A los 15 días se procedía a la extracción de los lóbulos tímicos fetales empleados en los cultivos organotípicos quiméricos humano-ratón (hu/moFTOC).

3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES ENRIQUECIDAS EN DIFERENTES POBLACIONES CELULARES TÍMICAS

Los fragmentos de timo humano se limpiaron de tejido conectivo antes de disgregarlos con un homogeneizador tipo Potter. La suspensión de células tímicas, previamente filtrada, fue enriquecida en timocitos inmaduros usando la técnica de *rossetting* con eritrocitos de carnero (Durviz, Valencia, España) previamente lavados (1800rpm 10min) con una solución NaCl al 0.9% (Panreac Química, Barcelona, España), y mezclados en una proporción de 15 eritrocitos por cada timocito en una concentración de 10^9 timocitos/10ml. La mezcla, primeramente centrifugada (1700rpm 7min), fue mantenida en un rotor durante 30 minutos a 4°C, modificando tanto la rotación del tubo como el ángulo del rotor cada 5 minutos. De esta

manera se obtenía una suspensión homogénea manteniéndose la integridad de las rosetas formadas. Finalmente, para separar las células libres de las rosetas, la suspensión era centrifugada en un gradiente de Ficoll (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, España) (1500rpm 30min 20°C). Posteriormente, las células libres, a la que denominaremos a partir de ahora fracción enriquecida (E-), fueron recogidas de la interfase y lavadas 3 veces en medio RPMI-1640 (Lonza-Hopkinton, MA, EEUU) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

La población E- fue utilizada para todos los estudios fenotípicos por citometría de flujo, así como para los distintos aislamientos de poblaciones intratímicas que se describen a continuación.

4. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES A PARTIR DE MUESTRAS DE GANGLIOS LINFÁTICOS

Las muestras de ganglios linfáticos fueron cuidadosamente limpiadas, eliminando el tejido adiposo de alrededor, y disgregadas mecánicamente con un homogeneizador tipo Potter. La suspensión obtenida tras ser filtrada y lavada (1000rpm 7min) fue centrifugada en un gradiente de Ficoll (Histopaque-1.077, Sigma-Aldrich) (1500rpm 30min 20°C). Las células de la interfase fueron recogidas y tras varios lavados (1000rpm 7min) utilizadas para los estudios fenotípicos por citometría de flujo.

5. AISLAMIENTO DE PRECURSORES TÍMICOS

La fracción E- fue deplecionada de timocitos maduros contaminantes, linfocitos B, células NK, granulocitos, macrófagos y DCs mediante separación magnética. Las células fueron incubadas en una concentración de 10^8 células/ml en PBS (Gibco, Life Technologies) 0.1% BSA (Sigma-Aldrich) adicionando cantidades saturantes de anticuerpos de ratón que reconocían las siguientes moléculas humanas: CD56 (Becton Dickinson, San José, CA, EEUU), CD4, CD19, CD14, CD11c y CD3 (Immunostep, Salamanca, España). Tras 30 minutos de incubación a 4°C las células fueron lavadas (4000rpm 4min 4°C) y resuspendidas con anticuerpos de oveja frente a IgG de ratón conjugados a esferas metálicas Dynabeads Pan Mouse IgG (Invitrogen, Life Technologies) en una relación esferas:células de 5:1. Tras una incubación de 30 minutos a 4°C con agitación intermitente, se separaron las células libres de las unidas a las esferas mediante un concentrador magnético de partículas DynaMag-Spin (Invitrogen, Life Technologies). Las células que no eran retenidas, también denominada fracción negativa, fueron recogidas, y tras repetición del anterior paso, lavadas y contadas en una cámara Neubauer. Posteriormente la

fracción negativa era marcada con anticuerpos anti-CD34 y anti-CD1 (ambos BD Biosciences) y las subpoblaciones $CD34^+$ totales o $CD34^+CD1^-$ separadas mediante *sorting* (FACSVantage Becton Dickinson del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM). En los experimentos que se indica la población fue marcada también con anti-BMPR-IA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) para separar las subpoblaciones $CD34^+CD1^-BMPR-IA^+$ y $CD34^+CD1^-BMPR-IA^-$. La pureza de las poblaciones obtenidas en cada caso fue siempre superior al 97%.

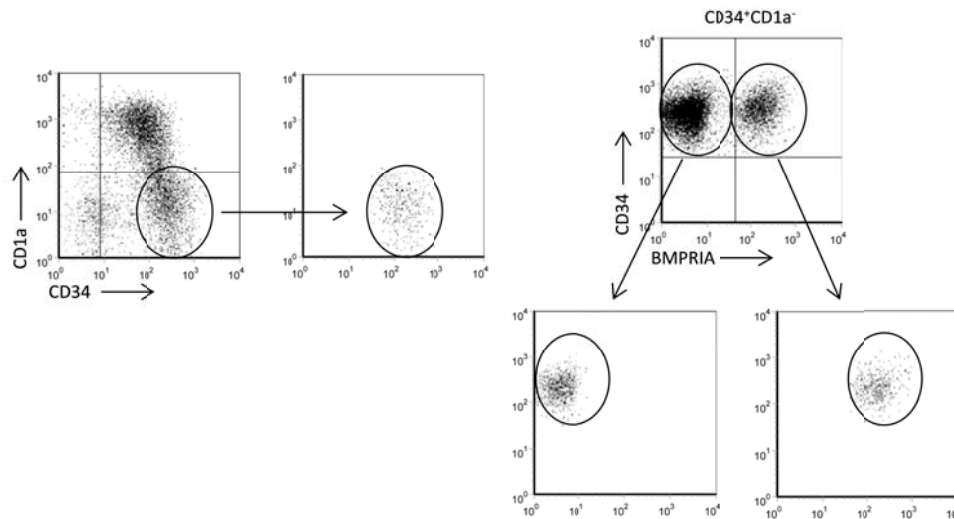


Figura 6. Aislamiento de diferentes subpoblaciones de precursors intratímicos.

6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK TÍMICAS

Las células NK fueron sorteadas a partir de la población enriquecida E^- , previamente deplecionada de manera similar al apartado anterior, utilizando en este caso anticuerpos biotinilados anti-CD3, anti-CD19, anti-CD14 y anti-CD15 (BioLegend, San Diego, EEUU) y posteriormente Dynabeads Biotin Binder (Invitrogen, Life Technologies). La fracción negativa fue marcada con anti-CD56 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y las células NK inmaduras (NK^{inm}) y maduras (NK) fueron aisladas de acuerdo a la intensidad de expresión de CD56 mediante *sorting* (FACSVantage Becton Dickinson del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM; Influx™ de BD (Beckton Dickinson) del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas –CIEMAT-).

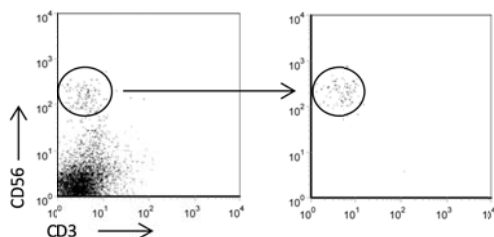


Figura 7. Aislamiento de células NK maduras intratímicas.

7. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA

Células mononucleares fueron obtenidas a partir de muestras de *buffy coat*, diluidas previamente con NaCl 0.9% (1:1), mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphocyte Isolation Solution, Rafer, Madrid, España) (300g 30min 20°C). Las células de la interfase fueron recogidas y lavadas 3 veces en tampón PBS suplementado con un 5% de SFB (ambos de Gibco, Life Technologies) (900rpm 10min 10°C). En los algunos casos estas células fueron empleadas para la realización de estudios por citometría de flujo.

Posteriormente, en función del diseño experimental, distintas poblaciones fueron aisladas mediante métodos inmunomagnéticos usando kits específicos: $CD56^{dim}CD16^{+}$ ($CD56^{+}CD16^{+}$ NK Cell Isolation Kit), $CD56^{bright}CD16^{-}$ ($CD56^{+}CD16^{-}$ NK Cell Isolation Kit), $CD56^{totales}CD3^{-}$ (NK Cell Isolation Kit) todos ellos de Miltenyi Biotec, y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

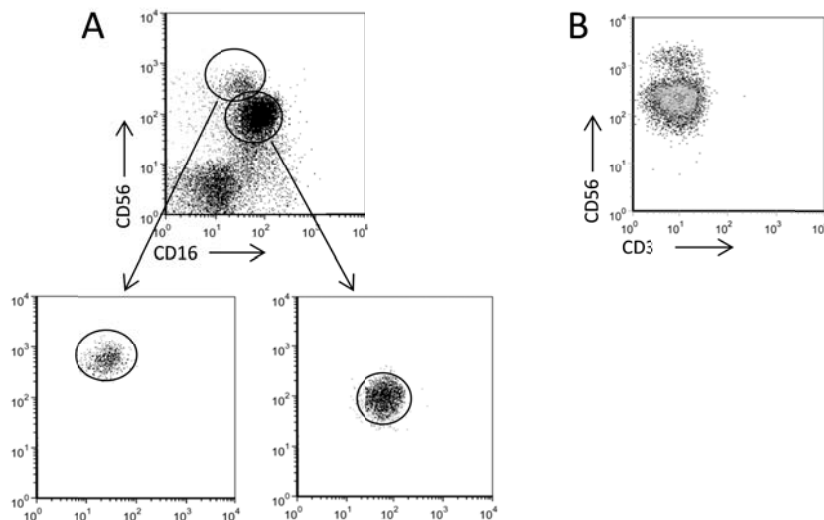


Figura 8. Aislamiento de células NK $CD56^{dim}CD16^{+}CD3^{-}$, $CD56^{bright}CD16^{-}CD3^{-}$ (A) y $CD56^{+}CD3^{-}$ Totales (B) de sangre periférica.

En los casos en los que se indica, la población de células NK totales, $CD56^{+}CD3^{-}$, y las poblaciones de linfocitos $CD4^{+}CD3^{+}$ y $CD8^{+}CD3^{+}$ fueron aisladas mediante sorting utilizando anticuerpos anti-CD56 (Miltenyi Biotec), anti-CD3 (Biolegend), anti-CD4 y anti-CD8 (Becton Dickinson).

8. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN

8.1 Cultivos orgánicos de lóbulos tímicos fetales (FTOC) quiméricos humano-ratón

Los lóbulos tímicos fueron extraídos de fetos de ratones inmunodeficientes (C.B17 SCID) de 15 días de desarrollo. Tras ser limpiados, cada lóbulo fue cultivado 48 horas en un sistema de gota pendiente en un pocillo de una placa Terasaki (Nunc, Naperville, IL, EEUU) junto con 15.000-20.000 células/lóbulo de las poblaciones de precursores tímicos indicados en cada figura, en un volumen de 25 μ l de RPMI-1640 suplementado con 1mM de piruvato sódico, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina (todos ellos de Lonza-Hopkinton), 7 % de SFB (Gibco, Life Technologies) y 3% de suero humano AB (LabClinics, Barcelona, España). A continuación, los lóbulos tímicos ya recolonizados con las células humanas, se transfirieron a filtros de policarbonato (tamaño poro de 3 μ m) (Millipore Ibérica, Madrid, España) manteniéndose flotando en FTOC (37°C 5%CO₂) durante diferentes periodos de tiempo indicados en cada figura. El medio utilizado fue el anteriormente descrito, renovado en un 30% cada 7 días. En los casos en los que se indican, los cultivos fueron tratados adicionando rh-BMP4 (100ng/ml) (Humanzyme Inc., Chicago, EEUU).

Tras el periodo de cultivo, los lóbulos tímicos se disgregaron mecánicamente y las células fueron usadas para diferentes diseños experimentales. Para el análisis fenotípico, las células fueron marcadas, además de con los anticuerpos indicados, con un anticuerpo anti-CD45 (Becton Dickinson) con el fin de reconocer las células humanas presentes en los cultivos. Por tanto todos los porcentajes mostrados de las distintas poblaciones están acotados a la población CD45⁺.

8.2 Generación de células NK a partir de progenitores tímicos

Células sorteadas Lin⁻CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ fueron cultivadas (37°C 5%CO₂) durante diferentes periodos de tiempo en una concentración de 0,1-0,3x10⁶cél/ml con medio RPMI-1640 (Lonza-Hopkinton) suplementado con 10% SFB, 1mM de piruvato sódico, 2mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (Todos ellos de Gibco, Life Technologies) (RPMI 10% SFB completo) en placas de fondo plano. La diferenciación de estos precursores hacia células NK fue inducida adicionando IL-15 (100ng/ml, salvo que otras dosis sean indicadas) y SCF (100ng/ml) (ambas de Prospec-Tany TechnoGene Ltd, East Brunkswick, NJ, EEUU), en ausencia o en presencia de dorsomorfina (DM; 5 μ M) (Calbiochem, Nottingham, RU) y rh-BMP4 (50ng/ml), solos o de manera conjunta, y durante todo el cultivo o de manera puntual según se detalle en el apartado de resultados y en los pie de figura.

En cada caso, el medio fue reemplazado en un 30% cada 5-6 días.

9. ENSAYOS DE ACTIVACIÓN

Células NK obtenidas en los diferentes protocolos anteriormente comentados (FTOC, generadas en cultivos en suspensión, células CD56⁺CD3⁻ intratímicas sorteadas o células CD56^{dim}CD16⁺ o CD56^{bright}CD16⁻ de sangre periférica aisladas por separación magnética) fueron estimuladas con IL-12 (10ng/ml)+IL-15 (100ng/ml) o IL-2 (50ng/ml)+IL-12 (10ng/ml)+PolyI:C (12.5µg/ml) (en el caso de las células NK totales, CD56⁺CD3⁻, de sangre periférica) en presencia o ausencia (CTRL/DMSO) de distintos tratamientos (DM/DMH1) a las concentraciones indicadas, en una concentración de 10⁶cél/ml en medio RPMI 10% SFB completo.

En el caso de las células NK intratímicas también se usaron como estímulos de activación PolyI:C (12,5µg/ml) o Pam3CSK4 (1µg/ml), según se indique en el pie de figura. Tras el tiempo de estimulación, indicado en cada caso, los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados para su posterior análisis. Además, se analizó la capacidad lítica, el fenotipo y/o el perfil génico de expresión de las células recuperadas, tal y como se describe en los apartados 14, 15 y 18 respectivamente (IL-12 Prospec-Tany TechnoGene Ltd; IL-2 Miltenyi Biotec; PolyI:C y Pam3CSK4 Invivogen; DMH1 Tocris Bioscience, R&D Systems).

En el caso de la figura 38B, células totales de la población enriquecida fueron cultivadas en una concentración de 0,3x10⁶/200µl en medio RPMI 5% SFB completo, en ausencia o presencia de los siguientes estímulos de activación: Pam3CysSerLys4 (1µg/ml), HKLM (10⁷cél/ml), PolyI:C (12,5µg/ml), LPS (100ng/ml), ST Flagellin (200ng/ml), FSL1 (100ng/ml), Imiquinod (1µg/ml), ssRNA (1µg/ml) y CpG (5µg/ml) (Todos ellos de Invivogen, San Diego, CA, EEUU). Tras 12 horas de estimulación se adicionó, en todos los casos, Brefeldina A (20µg/ml) (BioLegend), manteniendo el cultivo durante 4 horas adicionales. Posteriormente se procedió a la determinación de IFNγ por citometría de flujo tal y como se describe en el apartado 15.

10. GENERACIÓN MoDCS. CO-CULTIVOS CÉLULAS NK-DCs

Monocitos de sangre periférica fueron aislados a partir de muestras de *buffy coat* mediante selección positiva por separación magnética usando el kit CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec). Las células CD14⁺ purificadas fueron cultivadas a una concentración 10⁶cél/ml de medio RPMI 10% SFB en presencia de GM-CSF (20 ng/ml) e IL-4 (20ng/ml) (ambas de Invitrogen) durante 6 días (37°C 5%CO₂). La mitad del medio fue reemplazado cada 2 días manteniendo la misma concentración de citoquinas.

Por otro lado, células NK totales autólogas fueron aisladas y congeladas y 12 horas antes de que se completara la diferenciación de las DCs fueron puestas en cultivo en medio RPMI 10% SFB completo en ausencia (NK no activadas) o en presencia de IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) +PolyI:C (12.5μ/ml) tratadas o no (NK activadas DMSO) con DMH1 (20μM) (NK activadas DMH1) durante 12 horas.

Tras 6-7 días de cultivo se indujo la maduración de las DC inmaduras (iDCs) mediante la adición de las células NK previamente cultivadas y lavadas (x3), en un ratio de DC:NK 1:5, manteniendo los co-cultivos durante 36 horas (37°C 5%CO₂). En algunos casos las iDCs fueron cultivadas en ausencia de estímulo madurativo (medio) o inducida su maduración adicionando LPS (100ng/ml) (Invivogen). Todos los cultivos fueron realizados en RPMI 10% SFB completo.

11. DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA

La tasa proliferativa de células NK fue determinada mediante el kit específico 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (Roche Diagnostics, Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante. De esta manera, durante las últimas 12 horas de cultivo se añadió al medio de cultivo 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) a una concentración final de 10 μM. Después las placas fueron centrifugadas, y tras la eliminación del sobrenadante, secadas durante 2 horas a 65°C, fijadas con etanol en HCl (0.5M) 30 minutos a -20°C, tratadas con nucleasas 30 minutos a 37°C y finalmente incubadas con un anticuerpo anti-BrdU de ratón conjugado con peroxidasa durante 30 minutos a 37 °C. La reacción de la peroxidasa fue revelada con el sustrato ABTS (ácido 2,2'Azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6) sulfónico) y la absorbancia de las muestras fue determinada mediante un lector de ELISA (SUNRISE, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza) a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 492 nm.

En algunos casos, la proliferación de las células NK se determinó mediante tinción con CFSE (Sigma-Aldrich) previamente a su cultivo. De esta manera, tras el aislamiento las células NK fueron incubadas con CFSE en una concentración final de 5μM, durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, seguidamente fueron lavadas repetidas veces para la eliminación del CFSE sobrante. Tras 6 días de cultivo y mediante el análisis por citometría de flujo de la pérdida de CFSE, se llevó a cabo la determinación del porcentaje de células que se habían dividido.

12. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Independientemente del modelo experimental utilizado, la proporción de células apoptóticas fue determinada mediante tinción con Anexina-V-FLUOS (BioLegend) y yoduro de

propidio siguiendo el protocolo indicado, y posteriormente analizado en un citómetro de flujo FACSCalibur.

13. DETERMINACIÓN DE FACTORES SOLUBLES EN SOBRENADANTES

Sobrenadantes de distintos cultivos en suspensión así como de diferentes ensayos de activación fueron recogidos en los periodos de cultivo indicados en cada figura y almacenados a -80°C para su posterior análisis. La concentración de BMP4 (BMP-4 DuoSet ELISA, R&D systems), INF γ , TNF α e IL-12p70 (todos ellos de BioLegend) presente en los sobrenadantes fue determinada mediante ELISA (Lector SUNRISE, Tecan Group Ltd), según las instrucciones de los fabricantes. Asimismo, utilizando el sistema Cytometric Bead Array Flex Set (CBA) (BD BioScience) se determinaron los niveles de otros factores como GM-CSF, IL-10, IL-6, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 y CCL2/MCP-1 (todos ellos de BD Bioscience), siendo estas muestras analizadas en un citómetro FACSCalibur. En todos los casos la cuantificación de las distintas citoquinas y quimioquinas se llevó a cabo por duplicado y en el número de experimentos que se indica en los pie de figura.

14. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Diferentes poblaciones de células NK fueron activadas con distintas estrategias experimentales (ver apartado de ensayos de activación). Tras 12 horas de cultivo las células fueron recogidas, y tras determinar el número de células y la viabilidad, fueron usadas en un ensayo de citotoxicidad contra la línea tumoral K562, en los diferentes ratios célula efectora:célula diana (NK:K562) indicados. Los cocultivos se llevaron a cabo en medio RPMI-1640 suplementado con 1% SFB, 100U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina en un volumen total de 100 μ l durante 4 horas (37°C 5%CO₂). Tras este periodo, la actividad lítica de las células NK sobre las células K562 fue determinada mediante métodos colorimétricos a partir de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) detectada en el sobrenadante de los cultivos, utilizando un kit comercial Cytotoxicity Detection Kit LDH (Roche Diagnostics), y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

El porcentaje de lisis específica fue determinado según los valores de absorbancia usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotóxicidad} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{Valor mínimo de lisis}}{\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo}} \times 100$$

Siendo el valor mínimo el valor de lisis espontánea (actividad LDH) de las células K562 cultivadas en ausencia de células NK, y el valor máximo el valor de absorbancia de células K562 cultivadas en ausencia de células NK a las que tras 4 horas de cultivo se le adiciona una solución de lisis. En todos los casos los valores de absorbancia corresponden a la media de duplicados, y el número de experimentos se indica en cada apartado en los pie de figura.

15. CITOMETRÍA DE FLUJO

Los estudios fenotípicos se llevaron a cabo por citometría de flujo utilizándose los anticuerpos detallados en la Tabla 2. Las tinciones se llevaron a cabo incubando las células en PBS con concentraciones saturantes de los anticuerpos indicados en cada caso, durante 30 minutos a 4°C. Cuando el anticuerpo no estaba directamente conjugado a un fluorocromo, tras la incubación con un primer anticuerpo purificado se añadieron fragmentos F(ab')₂, frente a IgG de la especie en la que estaba hecho el anticuerpo primario y conjugado a fluorocromo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EEUU).

Para las tinciones intracelulares, las células fueron tratadas con la solución Cytofix/Citoperm (BD Bioscience) durante 20 minutos a 4°C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente fueron lavadas con la solución Perm/Wash (BD Bioscience) y marcadas con los anticuerpos contra granzima, perforina, IFN γ y BMP4. En el caso de granzima, perforina e IFN γ los anticuerpos utilizados estaban directamente conjugados a un fluorocromo. Para la detección de BMP4, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-BMP4 que no estaba conjugado, por lo que se llevó a cabo una segunda incubación con fragmentos F(ab')₂ de IgG de burro anti-cabra preabsorbidos y conjugados a fluorocromo (Jackson ImmunoResearch Laboratories), todos diluidos en Perm/Wash.

Por otro lado, para la detección de Smad1/5/8 fosforilada, las células fueron fijadas con BD cellFix (BD Bioscience) durante 30 minutos a 4°C para impedir cambios en el estado de fosforilación de las proteínas. Tras un lavado con PBS, las células fueron permeabilizadas incubando con BD Phosflow Perm Buffer III (BD Bioscience) 30 minutos a 4°C y posteriormente marcadas con anticuerpos anti-fosfo-Smad1/5/8 (Ser463/Ser465), seguido de fragmentos F(ab')₂ de IgG de burro anti-conejo preabsorbidos y conjugados a fluorocromo (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

En todos los casos, el análisis de los resultados se llevó a cabo en un citómetro de flujo de FACSCalibur (BD Biosciences) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

Molécula diana	Clon	Casa comercial	Molécula diana	Clon	Casa comercial
BMPRIA / ALK-3	Policlonal	R&D	CD62L	DREG-56	BD Biosciences
	Policlonal	Santa Cruz	CD69	FN50	Biolegend
	Policlonal	R&D	CD80	BB1	BD Biosciences
CCR1	53504	BD Biosciences	CD86	IT2.2 (305414)	Biolegend
CCR2	K036C2	Biolegend	CD94	DX22	Biolegend
CCR3	5E8	Biolegend	CD107a / LAMP-1	H4A3	Biolegend
CCR4	TG6/CCR4	Biolegend	CD116	MSB12	BD Biosciences
CCR5	HEK/1/85a	Biolegend	CD117	YB5.B8	BD Biosciences
CCR6	G034E3	Biolegend	CD122	MIK-β1	Inmunotools
CCR7	TG8/CCR7	Biolegend	CD127	R34.34	BD Biosciences
CCR7	G043H7	Biolegend	CD135	BV10A4GH2	CalTag
CCR9	BL/CCR9	Biolegend	CD158b / KIR2DL2/L3	DX27	Biolegend
CD1a	HI149	BD Biosciences	CD158e1 / KIR3DL1	DX9	Biolegend
CD3	33-2A3	Immunostep	CD161	DX12	BD Biosciences
	UTH-C1	Biolegend	CD215	JM7A4	Biolegend
CD4	RPA-T4	BD Biosciences	CD218a	BG/IL18RA	Biolegend
CD5	UCHT2	BD Biosciences	CD335 / NKp46	9E2	Biolegend
CD7	CD7-6B7	CalTag	CD336 / NKp44	P44-8	Biolegend
CD8	RPA-T8	BD Biosciences	CD337 / NKp30	P30-15	Biolegend
CD13	TüK1	CalTag	CX3CR1	2A9-1	Biolegend
CD16	VEP13	Miltenyi	CXCR1	8F1/CXCR1	Biolegend
CD31	WM59	Biolegend	CXCR2	5E8/CXCR2	Biolegend
CD33	WM53	BD Biosciences	CXCR3	1C6/CXCR3	BD Biosciences
CD34	581	BD Biosciences	CXCR4	12G5	Biolegend
	8G12	BD Biosciences	CXCR4	12G5	Biolegend
CD38	HIT2	BD Biosciences	CXCR5	RF8B2	BD Biosciences
CD44	G44-26	BD Biosciences	CXCR6	TG3/CXCR6	Biolegend
CD45RA	2DI	BD Biosciences	NKG2D	1D11	Biolegend
CD49d	9F10	BD Biosciences	S1P5/EDG-8	FAB3964A	R&D
CD56	B159	BD Biosciences	Granzima	GrA-11	Inmunotools
	AF12-7H3	Miltenyi	Perforina	delta G9	Inmunotools
	HCD56	Biolegend	BMP4	Policlonal	Santa Cruz
CD57	TB03	Miltenyi	pSmad1/5/8	Policlonal	Santa Cruz

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo

16. INMUNOFLUORESCENCIA

Pequeños fragmentos tímicos fueron embebidos en OCT (Tissue-Tek, Miles, Elkhart, In., EEUU), congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta el momento de la preparación de las muestras. Posteriormente los fragmentos fueron atemperados a -20°C y las crio secciones fueron obtenidas en un criostato (Shandon Cryotome E; Thermo Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA), secadas durante 2 horas a temperatura ambiente y fijadas en acetona (Panreac Química) durante 10 minutos.

Para la identificación de células NK CD56⁺CD3⁻, la unión inespecífica fue bloqueada mediante la incubación con 1% suero de burro (Santa Cruz Biotechnology), y posteriormente las secciones fueron secuencialmente incubadas con un anticuerpo hecho en conejo contra CD56 (Cell Marque, California, USA), IgG de burro frente a conejo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Life Technologies), un anticuerpo hecho en ratón frente a CD3

(Immunostep) e IgG de burro contra ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, en una cámara oscura y húmeda, durante 1 hora. Entre incubación e incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS.

Finalmente las muestras fueron montadas con Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Life Technologies) y observadas en un microscopio Confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM.

17. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Lóbulos tímicos reconstituidos con diferentes subpoblaciones de precursores fueron fijados por inmersión en tampón cacodilato 4% de glutaraldehído, postfijados con tetróxido de osmio al 1% y finalmente deshidratados en acetona para su inclusión en resina Araldite (Sigma-Aldrich). Las secciones fueron obtenidas en un ultramicrotomo OM-U3 (Reichert Inc., Buffalo, NY, EEUU). Posteriormente las secciones ultrafinas fueron doblemente contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo y analizadas en un microscopio electrónico JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japón) en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM.

18. ANÁLISIS POR RT-PCR PUNTO FINAL

El ARN fue aislado y purificado mediante el kit Absolutely RNA Microprep (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EEUU) el cual incluye un paso de digestión con ADNasa para eliminar la contaminación por ADN genómico. El ADN complementario total (ADNc) fue sintetizado con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ADNs obtenidos fueron empleados como molde para el análisis por PCR punto final usando la Taq ADN polimerasa AmpliTaqGold (Applied Biosystem) y añadiendo en cada caso los cebadores específicos para cada gen (Tabla 3). En todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Los productos de la PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%, siendo los tamaños obtenidos los esperados.

Gen	Forward (3'-	Reverse (5'-3')	T	Prod
β -actina	AGAGATGGCCAC	ATTGCGGTGGACGATGGAG	5	298
BMP4	AAAGGGGCTTCC	CCGCTGTGAGTGCTTAG	5	386
BMPRIA	CATTCGATGGCTG	TCCATATCGGCCTTTACCAA	5	298
BMPRIB	CATGCTTTTGCGA	CAGGCAACCCAGAGTCATCC	6	197
ActRIA	GGTCCCAATGAC	CGAGCGAGGTTAGGGTGGTT	6	416
BMPRII	AAGCGAGGTTGG	TTTGGCACACGCCTATTATGT	5	495
SMAD1	GCAAAGTCGGAA	GAGGTGAACCCATTTGAGTAA	6	308
SMAD4	CAGCACCACCCGC	CCAAACATCACCTTCACCTTTA	6	330
SMAD5	TCCAGCAGTAAAG	TGGAAACGTGGCATTGTTG	5	487
SMAD8	ACGTCGGGGGAG	GGTGACATCCTGGCGATGA	6	277

Tabla 3. Secuencias cebadoras empleadas para los ensayos de RT-PCR

19. ANÁLISIS POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (PCRq)

Adicionalmente, los ADNc obtenidos por RT-PCR se emplearon para el estudio por PCR cuantitativa en tiempo real usando los siguientes ensayos TaqMan (Tabla 4):

<i>GNB2L1</i>	Hs00272002_m1	<i>CCL1</i>	Hs00171072_m1
<i>GATA2</i>	HS00231119_m1	<i>CCL2</i>	Hs00234140_m1
<i>GATA3</i>	Hs00231122_m1	<i>CCL3</i>	Hs00234142_m1
<i>ID2</i>	Hs00747379_m1	<i>CCL4</i>	Hs00237011_m1
<i>ID3</i>	Hs00171409_m1	<i>CCL5</i>	Hs00174575_m1
<i>NFIL3</i>	Hs00993282_m1	<i>CXCL10</i>	Hs01124251_g1
<i>RUNX1</i>	Hs01021971_m1	<i>XCL1</i>	Hs00751481_s1
<i>HES1</i>	Hs00172878_m1	<i>BMPR1B</i>	Hs00176144_m1
<i>ETS1</i>	Hs00428287_m1	<i>BMPR2</i>	Hs00176148_m1
<i>PU.1</i>	Hs00231368_m1	<i>BMP2</i>	Hs00154192_m1
<i>SPIB</i>	Hs00162150_m1	<i>BMP4</i>	Hs00370078_m1
<i>BCL11B</i>	Hs00256257_m1	<i>BMP6</i>	Hs01099594_m1
<i>BMPR1A</i>	Hs01034909_g1	<i>BMP7</i>	Hs00233476_m1
<i>RUNX3</i>	Hs00231709_m1	<i>ACVR1</i>	Hs00153836_m1
<i>TBX21 (TBET)</i>	Hs00203436_m1	<i>SMAD1</i>	Hs00195432_m1
<i>IL2RB</i>	Hs01081697_m1	<i>SMAD4</i>	Hs00929647_m1
<i>LGALS1</i>	Hs00355202_m1	<i>SMAD7</i>	Hs00998193_m1
<i>GZMA</i>	Hs00989184_m1	<i>BAMBI</i>	Hs00180818_m1
<i>PRF1</i>	Hs00169473_m1	<i>NOG</i>	Hs00271352_s1
<i>S1PR5</i>	Hs00928195_s1	<i>TWSG1</i>	Hs00221028_m1
<i>S1PR1</i>	Hs01922614_s1	<i>TGFB1</i>	Hs00998133_m1
		<i>SMAD3</i>	Hs00969210_m1

Tabla 4. Ensayos TaqMan empleadas para PCR cuantitativa a tiempo real.

Como control endógeno se utilizó el gen GNB2L1 (todos ellos de Applied Biosystem). Todas las PCR fueron realizadas por duplicado usando el TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) conforme a las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones, detecciones y análisis fueron realizados en un 7.900HT Fast-Real Time PCR System (Centro de Genómica, Universidad Complutense Madrid). Para la normalización con GNB2L1 se empleó el método del ΔC_t .

20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se aplicó una “t” de Student con los siguientes niveles de significación * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

RESULTADOS

1. PAPEL DE BMP4 EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS NK EN TIMO HUMANO

1.1 Precursores tímicos humanos expresan componentes de la vía canónica de señalización BMP

Como primera aproximación al estudio del papel de BMP4 en el timo humano se determinó si los precursores intratímicos humanos, $CD34^+$ totales y de manera más concreta los precursores $CD34^+CD1a^-$, podían ser blanco de la señalización BMP. Para ello, a partir de muestras de ARN total obtenidas de ambas subpoblaciones de precursores, y usando oligonucleótidos cebadores específicos, se analizó la expresión de los distintos componentes de la vía canónica de señalización BMP. El análisis por RT-PCR indicó que los progenitores más primitivos $CD34^+CD1a^-$ presentaban transcritos específicos para receptores tipo I, BMPRIA y BMPRIB, y para el receptor tipo II, BMPRII, así como para las proteínas BR-Smad (SMAD1, 5 y 8) y la proteína Co-Smad (SMAD4) (Figura 9A).

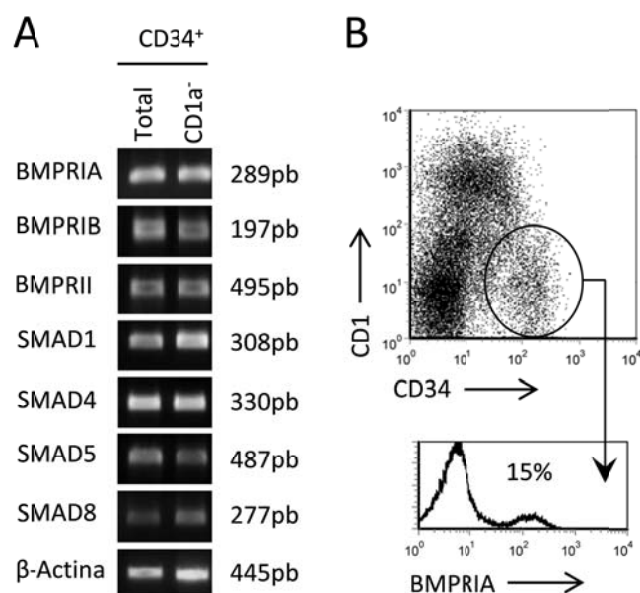


Figura 9. Expresión de los componentes de la vía de señalización BMP en precursores intratímicos humanos. (A) Análisis por RT-PCR punto final de la expresión de diferentes componentes de la vía de señalización BMP en precursores $CD34^+$ totales y $CD34^+CD1a^-$ purificados. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. (B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de BMPRIA en precursores $CD34^+CD1a^-$. Se muestra un experimento representativo de al menos 10 experimentos independientes.

Asimismo, estudiamos mediante citometría de flujo la expresión en los precursores $CD34^+CD1a^-$ del receptor tipo I BMPRIA por ser, como ya ha sido mencionado, el de expresión más extendida y pleiotrópica. El estudio fenotípico mostró que entre un 10 y un 20% de estos progenitores expresaban dicho receptor (Figura 9B).

1.2 BMP4 bloquea la diferenciación de precursores $CD34^+$ intratímicos hacia el linaje T

Puesto que los precursores intratímicos $CD34^+CD1a^-$ expresaban toda la maquinaria molecular necesaria para la transducción de la señal BMP, el siguiente paso fue analizar el papel de BMP4 en la diferenciación T humana. A partir de lóbulos tímicos de ratones SCID de 15 días de gestación reconstituidos con precursores tímicos $CD34^+CD1a^-$ humanos, se

realizaron cultivos orgánicos tímicos quiméricos en presencia o ausencia de BMP4. El análisis fenotípico de las células humanas recuperadas mostró que la adición de BMP4 a estos cultivos provocaba una drástica inhibición de la diferenciación T, siendo la subpoblación de timocitos DP, $CD4^+CD8^+$, la más afectada con una reducción que llegaba a ser entre un 40 y un 70% (Figura 10A).

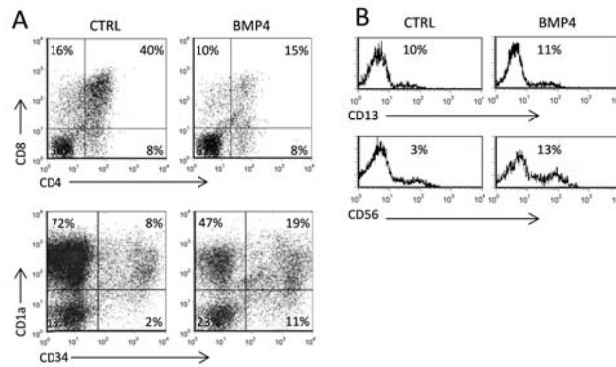


Figura 10. Efecto de BMP4 en la diferenciación T humana. Se analizó mediante citometría de flujo el fenotipo de las células humanas ($CD45^+$) recuperadas a partir de FTOCs quiméricos humano-ratón cultivados durante 12 días en ausencia (control) o en presencia de BMP4 (100ng/ml). Los datos mostrados corresponden a un FTOC representativo de 8 experimentos independientes, indicándose los porcentajes de las poblaciones de timocitos definidas según la expresión de CD4 y CD8, ó CD34 y CD1a (A), así como el porcentaje de células dendríticas ($CD13^+$) y células NK ($CD56^+CD3^-$) recuperadas en estos cultivos (B).

Por el contrario, la subpoblación DN, $CD4^-CD8^-$, se incrementó de 2 a 3 veces con el tratamiento de BMP4. Este aumento se correspondía en gran medida a los progenitores $CD34^+$ cuyo porcentaje se triplicó respecto a los cultivos control (Figura 10A). Sin embargo, como se observa en la Figura 10B la subpoblación de células $CD56^+CD3^-$, incluida en el compartimento $CD4^-CD8^-$, fue la que experimentó mayores incrementos tras el tratamiento con BMP4 alcanzándose valores en los cultivos orgánicos cercanos al 15% respecto al 2-3% obtenidos en los cultivos control (Figura 10B). La subpoblación de células dendríticas no se vio afectada por la adición de BMP4.

1.3 Progenitores $CD34^+CD1a^-BMPRIA^+$ presentan características típicas de progenitores de células NK

Dado que existía una población de precursores capaces de responder a BMP4 nos planteamos estudiar si esta población presentaba características que pudieran relacionarla con alguna subpoblación en particular. Para ello, estudiamos el perfil fenotípico y génico de los progenitores $CD34^+CD1a^-$, comparando aquellos que expresan el receptor de BMP tipo IA, frente a los que no lo expresan.

El análisis por citometría de flujo indicó que los precursores $CD34^+CD1a^-BMPRIA^+$ expresaban mayoritariamente marcadores clásicamente relacionados con la diferenciación de células NK, tales como CD161, o CD122 y CD215, cadenas β y α respectivamente del receptor de IL-15, citoquina descrita imprescindible para la diferenciación de dicho linaje⁹¹⁻⁹⁴ mientras que, aquellos precursores que no expresaban el receptor BMPRIA, tampoco expresaban

ninguno de estos marcadores. Asimismo existía una expresión diferencial de CD116, CD135, CD127 o CD117, receptores para distintas citoquinas también relacionadas con la diferenciación de células NK^{43,94,95} siendo esta expresión siempre mayor en los progenitores BMPRIA⁺. Por el contrario, los niveles de expresión de CD5 eran inferiores en estos precursores frente a aquellos que no expresaban el receptor de BMP. Otros marcadores fueron también analizados, no existiendo diferencias remarcables entre ambas subpoblaciones de precursores. Hay que resaltar que ninguna de las dos poblaciones expresaba CD94 (Figura 11A).

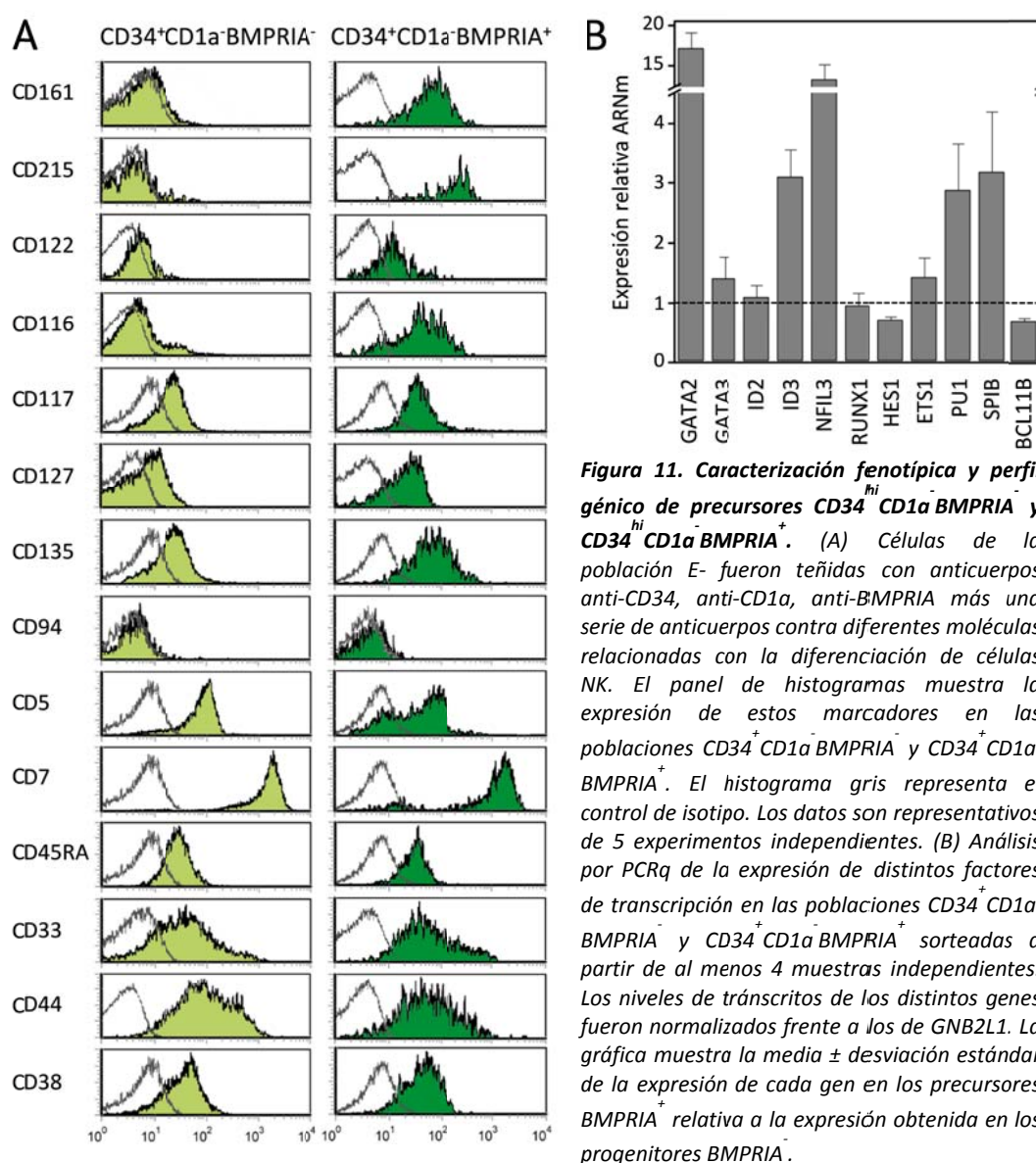


Figura 11. Caracterización fenotípica y perfil génico de precursores CD34^{hi}CD1a⁻BMPRIA⁻ y CD34^{hi}CD1a⁻BMPRIA⁺. (A) Células de la población E- fueron teñidas con anticuerpos anti-CD34, anti-CD1a, anti-BMPRIA más una serie de anticuerpos contra diferentes moléculas relacionadas con la diferenciación de células NK. El panel de histogramas muestra la expresión de estos marcadores en las poblaciones CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ y CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺. El histograma gris representa el control de isotipo. Los datos son representativos de 5 experimentos independientes. (B) Análisis por PCRq de la expresión de distintos factores de transcripción en las poblaciones CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ y CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ sorteadas a partir de al menos 4 muestras independientes. Los niveles de transcritos de los distintos genes fueron normalizados frente a los de GNB2L1. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de la expresión de cada gen en los precursores BMPRIA⁺ relativa a la expresión obtenida en los progenitores BMPRIA⁻.

Del mismo modo, el estudio del perfil génico por PCRq reveló una expresión mayor de factores relacionados con la diferenciación de células NK en los precursores BMPRIA⁺, mientras que factores relacionados con el linaje T tenían una expresión disminuida respecto a la

subpoblación de precursores que no expresaban el receptor. Así, la expresión de NFIL3, factor de transcripción descrito esencial para la diferenciación de células NK en ratón^{76,77}, fue 10 veces mayor en la subpoblación BMPRIA⁺. Asimismo, la expresión de ID3, proteína también implicada en la diferenciación de este linaje, fue 3 veces superior en estos mismos precursores. La expresión de GATA2, así como PU1 o SPIB, también era mayor en los precursores BMPRIA⁺. Sin embargo, la expresión de los factores de transcripción HES1 y BCL11B, implicados en la diferenciación T^{246,247}, fue menor en los precursores CD34^{hi}CD1a⁻BMPRIA⁺ que en los BMPRIA⁻, (Figura 11B). No se encontraron diferencias en la expresión de otros factores de transcripción como GATA3, ID2, RUNX1 o ETS1.

Dado que los datos anteriores indicaban que los precursores BMPRIA⁺ expresaban marcadores y factores de transcripción de genes relacionados con la diferenciación de células NK, analizamos la expresión del receptor en dos subpoblaciones de precursores intratímicos con distinto grado de compromiso hacia este linaje. Tanto los precursores CD34^{lo}CD44^{hi}CD5^{lo/-} como CD34^{lo}CD44^{lo}CD5⁺ son capaces de generar células NK, siendo sin embargo mucho más eficiente la población CD34^{lo}CD44^{hi}, puesto que la población CD34^{lo}CD44^{lo} diferencia principalmente hacia células T²⁴⁸. En correlación con los resultados previos, la expresión del receptor de BMP tipo IA era significativamente mayor en la población CD34^{lo}CD44^{hi}, con mayor capacidad para diferenciar hacia células NK, que en la población CD34^{lo}CD44^{lo} (Figura 12).

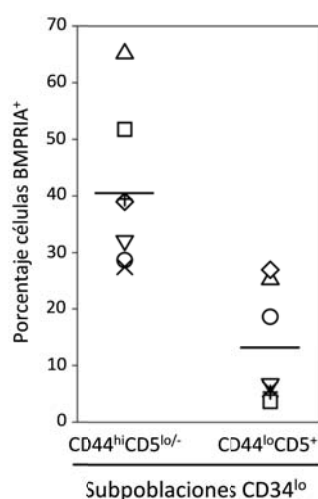


Figura 12. Expresión de BMPRIA en diferentes subpoblaciones de precursores tímicos. Análisis multiparamétrico por citometría de flujo del porcentaje de células BMPRIA⁺ en las subpoblaciones de precursores CD34^{lo}CD44^{hi}CD5^{lo/-} y CD34^{lo}CD44^{lo}CD5⁺. La gráfica de dispersión muestra los valores de los porcentajes de células BMPRIA⁺, representando las barras horizontales la media de 7 experimentos independientes (* p ≤ 0,05)

1.4 Los precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ diferencian principalmente a células NK

A tenor de los anteriores resultados, las células CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ presentaban características de progenitores intratímicos de células NK, por lo que el siguiente paso fue comparar el potencial de diferenciación de esta población BMPRIA⁺ con el potencial de la

población $BMPRIA^-$. Para ello, llevamos a cabo cultivos orgánicos quiméricos de lóbulos tímicos de ratones SCID reconstituidos con precursores $CD34^+CD1a^-BMPRIA^-$ o $CD34^+CD1a^-BMPRIA^+$.

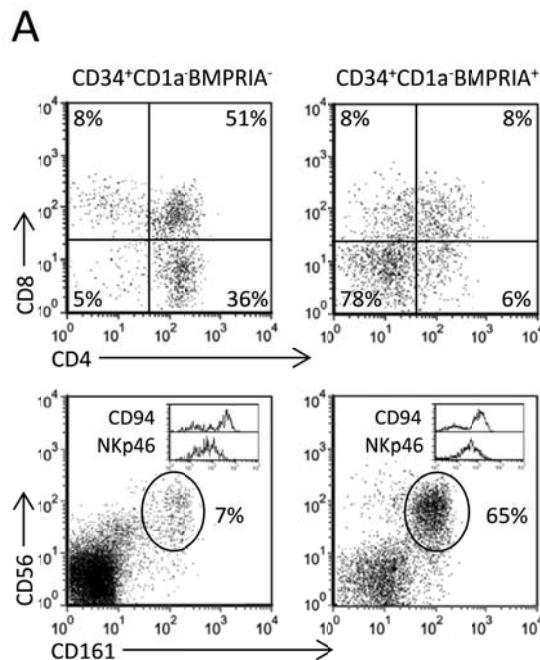
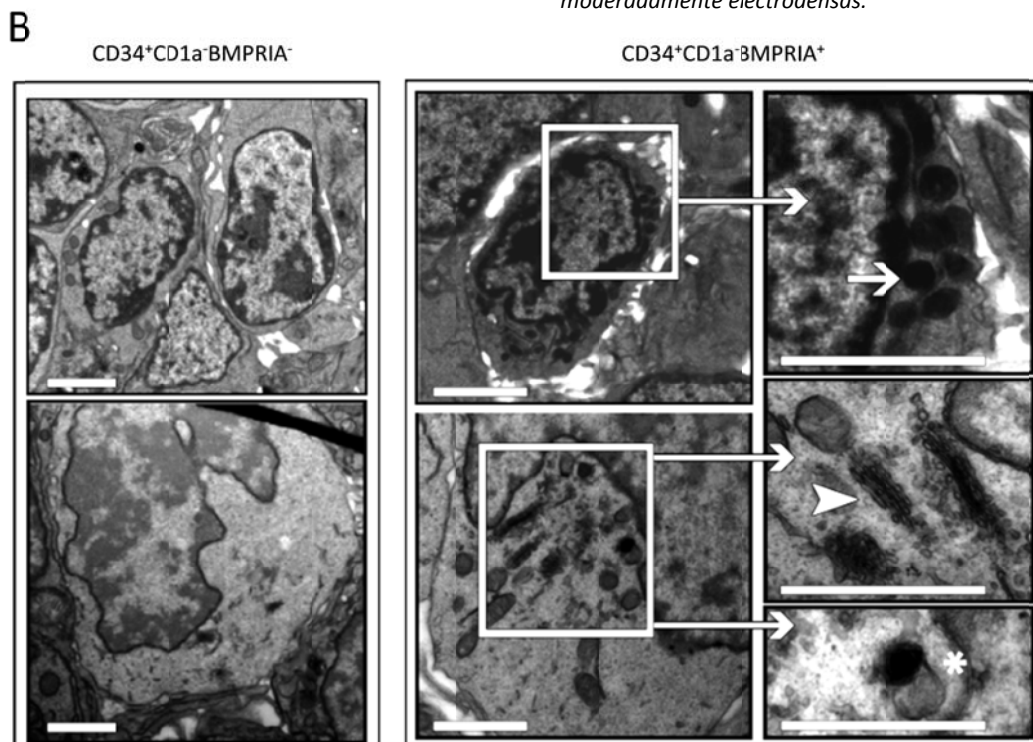


Figura 13. Potencial de diferenciación de los precursores $CD34^+CD1a^-BMPRIA^-$ y $CD34^+CD1a^-BMPRIA^+$. FTOCs quiméricos humano-ratón fueron reconstituidos con las poblaciones $CD34^+CD1a^-BMPRIA^-$ y $CD34^+CD1a^-BMPRIA^+$ sorteadas. (A) Tras 9 días de cultivo, se analizó por citometría de flujo, el porcentaje de células T y de células NK dentro de las células humanas ($CD45^+$) recuperadas, utilizando los marcadores $CD4/CD8$, y $CD56/CD161(CD3)$ respectivamente. Los histogramas muestran la expresión de $CD94$ y $NKp46$ en las células $CD56^+CD3^-$. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes, con al menos 3 lóbulos tímicos por experimento. (B) Estudio mediante microscopía electrónica de transmisión de los lóbulos reconstituidos con precursores $BMPRIA^-$ y $BMPRIA^+$. Las barras de escala representan $2\mu m$. La flecha indica la presencia de gránulos electrodensos. La punta de flecha muestra el importante desarrollo del aparato de Golgi y el asterisco vesículas secretoras moderadamente electrodensas.



En aquellos lóbulos reconstituidos con precursores $BMPRIA^-$ el porcentaje de células NK generadas no superó el 10%, presentando un elevado porcentaje de células un fenotipo típico de células T. Por el contrario, el número absoluto de células NK en los lóbulos reconstituidos con precursores $BMPRIA^+$ era mucho mayor, así como el porcentaje, llegando a representar el

70% de las células humanas recuperadas, mientras que el de los timocitos DP no superaba el 10% (Figura 13A). En ambos cultivos las células NK generadas expresaban los receptores CD94 y NKp46, característicos de células NK maduras.

En correlación con estos datos, el análisis por microscopía electrónica de transmisión de los lóbulos tímicos reconstituidos con precursores BMPRIA⁻ o BMPRIA⁺ reveló notables diferencias. En aquellos lóbulos reconstituidos con precursores BMPRIA⁺ predominaban células con abundantes gránulos electrodensos, presumiblemente células NK maduras. También aparecían células con un importante desarrollo del aparato de Golgi y vesículas inmaduras, que presumiblemente se corresponderían con células NK inmaduras en diferenciación. Por el contrario, en los lóbulos reconstituidos con progenitores que no expresaban BMPRIA, entre las células estromáticas se observaban predominantemente linfocitos con alta relación núcleo/citoplasma, así como linfoblastos. En ningún caso se apreciaban gránulos electrodensos en el citoplasma de estas células (Figura 13B).

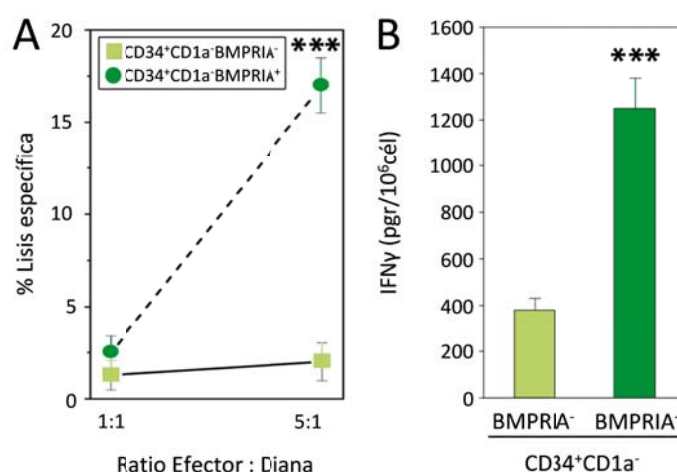


Figura 14. Precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ generan células NK funcionales. Lóbulos tímicos de ratón fueron reconstituidos con las poblaciones intratímicas humanas CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ y CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ sorteadas. Tras 9 días de cultivo organotípico quimérico humano-ratón, las células recuperadas fueron estimuladas durante 12 horas en presencia de IL-12 (10ng/ml) + IL-15 (100ng/ml). (A) Posteriormente se determinó, en igualdad de número de células humanas recuperadas, su capacidad lítica contra la línea tumoral K562 en un ensayo de citotoxicidad basado en la medida de la actividad de la enzima LDH. (B) Adicionalmente, se analizó la cantidad de IFNγ presente en los sobrenadantes recuperados tras 12 horas de estimulación. En este caso, los datos mostrados están referidos al número de células humanas recuperadas, y en ambos casos se representa la media ± desviación estándar de entre 3 y 5 experimentos independientes (***) $p \leq 0,001$

Asimismo, dado que los precursores BMPRIA⁺ eran capaces de generar un mayor número de células NK, analizamos la capacidad funcional de las células generadas en estos cultivos. En un ensayo de citotoxicidad contra la línea tumoral K562, las células generadas a partir de precursores BMPRIA⁻ presentaban una actividad citotóxica prácticamente nula, mientras que

las células generadas a partir de precursores BMPRIA⁺ presentaban una actividad lítica significativamente mayor. Asimismo, la producción de IFN γ era significativamente mayor en aquellos cultivos reconstituidos con progenitores BMPRIA⁺ que en los reconstituidos con precursores BMPRIA⁻ (Figura 14).

Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de las células CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ para generar fundamentalmente células NK en un microambiente tímico y por tanto apoyan la idea de que esta subpoblación contiene los progenitores tímicos para este linaje.

1.5 La diferenciación de las células NK intratímicas ocurre a través de un estadio intermedio BMPRIA⁺

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la expresión de BMPRIA estaba ligada a la diferenciación de células NK intratímicas. Para ello, precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ fueron cultivados en un ensayo *in vitro* en presencia de IL-15 y SCF, citoquinas que inducen la diferenciación de células NK ²¹. Tras 48 horas de cultivo, alrededor de un 15% de las células habían adquirido la expresión de BMPRIA. Además prácticamente la totalidad de estas células expresaban el marcador CD161, clásicamente relacionado con el linaje NK (Figura 15A). Esta correlación se mantuvo durante los siguientes días de cultivo y se acompañaba de una pérdida de expresión de CD5 (Figura 15B). Aunque la frecuencia de esta población CD161⁺BMPRIA⁺ fue incrementando en los días posteriores, a medida que las células adquirían la expresión de marcadores de células NK típicos de estadios de diferenciación más avanzados, tales como CD56, CD94 o NKp46, la expresión de BMPRIA fue disminuyendo. De esta manera, tras 9 días de cultivo, sólo en torno a un 20% de la población con un fenotipo característico de células maduras, CD161⁺CD56⁺CD94⁺, era positiva para el receptor de BMP (Figura 15C).

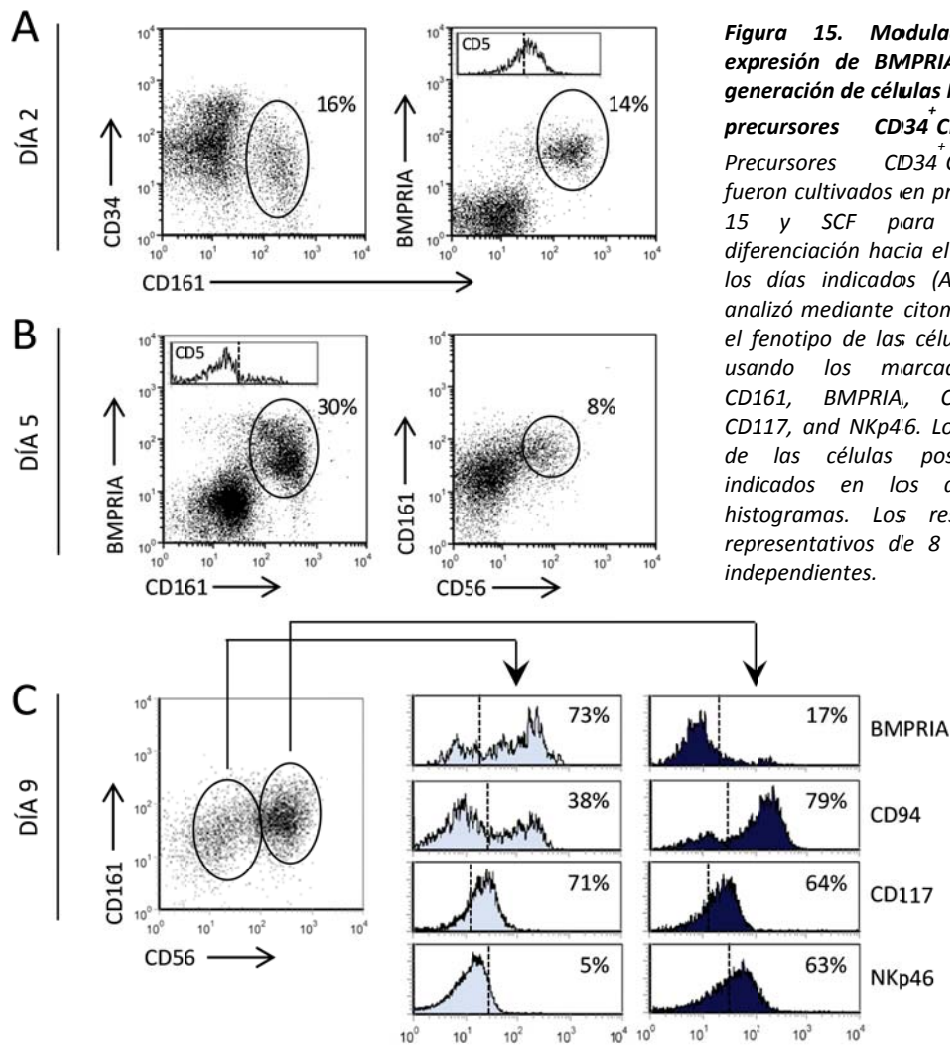


Figura 15. Modulación de la expresión de BMPRIA durante la generación de células NK a partir de precursores $CD34^+ CD1a^- BMPRIA^-$.

Precursores $CD34^+ CD1a^- BMPRIA^-$ fueron cultivados en presencia de IL-15 y SCF para inducir su diferenciación hacia el linaje NK. En los días indicados (A, B y C) se analizó mediante citometría de flujo el fenotipo de las células presentes usando los marcadores CD34, CD161, BMPRIA, CD56, CD94, CD117, and NKp46. Los porcentajes de las células positivas están indicados en los dot plots e histogramas. Los resultados son representativos de 8 experimentos independientes.

Por otro lado, estudiamos en estos cultivos la modulación de la expresión de distintos genes mediante PCRq. En línea con los resultados anteriores, el análisis mostró un incremento progresivo de los niveles de ARN mensajero para BMPRIA, y en paralelo también incrementaban los niveles de factores de transcripción claves para la diferenciación de células NK. De esta manera a medida que aumentaba de manera notable la expresión de NFIL3, ID2, ID3, RUNX3, GATA3, TBET o IL2R β , también lo hacía la expresión de BMPRIA. Por el contrario, los niveles de expresión de otros genes relacionados con la diferenciación T, como HES1 y BCL11B, fueron disminuyendo desde los primeros días de cultivo (Figura 16).

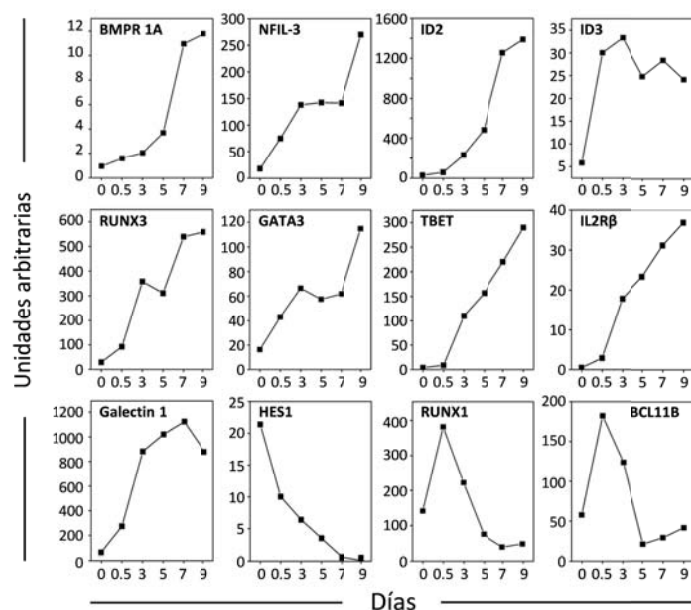


Figura 16. Modulación de la expresión génica durante la generación de células NK. Células NK fueron generadas en cultivos en suspensión a partir de progenitores $CD34^+ CD1a^- BMPRIA^-$ adicionando IL-15 y SCF. Se analizó por PCRq la expresión de BMPRIA y otros genes relacionados con la diferenciación de células NK en las células recuperadas en los tiempos indicados. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. Los datos mostrados son representativos de al menos 3 experimentos.

1.6 Papel de la señalización BMP en la diferenciación de las células NK intratímicas

Puesto que los resultados anteriores apuntaban a que los progenitores intratímicos eran capaces de generar células NK a través de un estadio de diferenciación sensible a BMP, a continuación analizamos el papel que la señalización BMP podría estar jugando en la diferenciación de estas células.

1.6.1 BMP4 se produce de manera autocrina durante la diferenciación de las células NK generadas a partir de precursores tímicos

Para abordar este objetivo lo primero que analizamos fue la producción de BMP4 a lo largo de la diferenciación de las células NK intratímicas. Para ello usamos cultivos similares a los del apartado anterior, en los cuales medimos por ELISA la producción de BMP4. Como muestra la Figura 17A, la producción autocrina del morfógeno comenzaba desde los primeros momentos del cultivo, y aumentaba a medida que las células se diferenciaban hacia células NK. Estos datos fueron corroborados por citometría de flujo estudiando la expresión citoplásmica de BMP4 en las células tras 7 días de cultivo. Las células NK inmaduras $CD161^+ CD56^-$, y en mayor medida, las células que estaban en un estadio de diferenciación más avanzado, $CD161^+ CD56^+$, producían BMP4 (Figura 17B).

Por tanto, durante la diferenciación de las células NK a partir de precursores intratímicos, no sólo ocurre una regulación positiva de la expresión de BMPRIA en los primeros estadios sino también un aumento en la producción de su ligando BMP4.

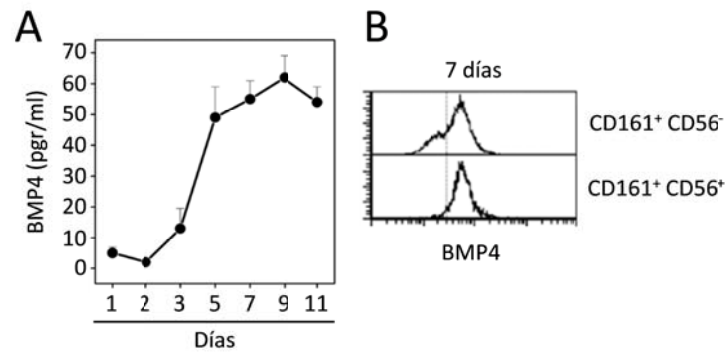


Figura 17. Producción autocrina de BMP4 en la diferenciación de las células NK intratímicas. (A) Precusores $CD34^{+}CD1a^{-}BMPRIA^{-}$ fueron cultivados en presencia de IL-15 (100ng/ml) + SCF (100ng/ml) y los niveles de BMP4 fueron determinados por ELISA en los sobrenadantes de estos cultivos recuperados a diferentes días. Los datos mostrados se corresponden con la media \pm desviación estándar de 3-4 experimentos independientes. (B) Los histogramas muestran los niveles de BMP4 determinados por citometría de flujo en las células recuperadas tras 7 días de cultivo. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

1.6.2 El bloqueo de la señalización BMP inhibe la diferenciación de las células NK intratímicas

Con el fin de conocer en este contexto el papel de la señalización de BMP4, diferenciamos células NK a partir de precusores $CD34^{hi}CD1a^{-}BMPRIA^{-}$ en presencia o ausencia de dorsomorfina (DM), un inhibidor de la actividad serin-treonín quinasa de los receptores de BMP tipo I²⁴⁹. Tras diferentes días de cultivo analizamos el efecto del bloqueo de la vía de señalización BMP sobre el número de células recuperadas y sobre el fenotipo de las mismas, observando que la adición de dorsomorfina provocaba una drástica disminución en el número de células NK generadas en el cultivo (Figura 18A). Además el bloqueo afectaba principalmente al porcentaje de células inmaduras, puesto que éste disminuía de manera notable respecto al cultivo control (Figura 18B). La adición de BMP4 contrarrestaba los efectos de la dorsomorfina sobre la diferenciación NK, descartando un posible efecto tóxico del inhibidor (Figura 18B).

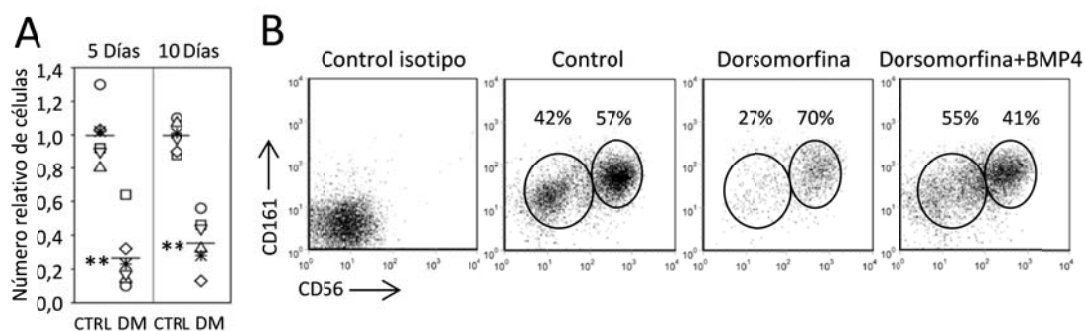


Figura 18. Efecto del bloqueo de la señalización BMP en la diferenciación de las células NK. Células NK fueron generadas *in vitro* con IL-15 (100ng/ml) + SCF (100ng/ml) a partir de precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIa⁻, en ausencia (CTRL) o presencia de DM (5μM), sola o junto con BMP4 (50ng/ml). (A) La gráfica muestra los datos de células recuperadas en presencia de DM respecto a las células recuperadas control en los días indicados. La barra horizontal representa la media de 6 experimentos independientes (**p ≤ 0,01) (B) Fenotipo de las células NK, según la expresión de CD161 y CD56, recuperadas tras 10 días de cultivo. Los datos mostrados son representativos de al menos 4 experimentos independientes.

1.6.3 BMP4 regula la proliferación y la supervivencia durante la generación de las células NK intratímicas

Para conocer si los resultados observados del bloqueo de la señalización BMP4 en la diferenciación de células NK intratímicas, podría estar reflejando un efecto del morfógeno en proliferación y/o supervivencia celular, analizamos en cultivos similares a los de apartado anterior la tasa proliferativa y la viabilidad de las células presentes en cultivos de 5 días.

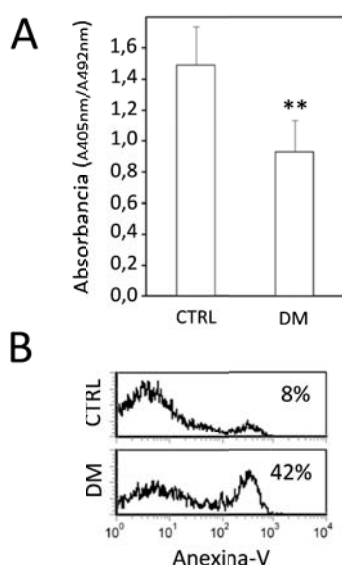


Figura 19. Efecto del bloqueo de la señalización BMP durante la diferenciación de células NK intratímicas: Impacto en proliferación y viabilidad celular. Precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIa⁻ fueron cultivados en presencia de IL-15 (100ng/ml) + SCF (100ng/ml), solos (CTRL) o tratados con DM. (A) Tras 5 días de cultivo, se añadió BrdU durante las siguientes 12 horas y un kit específico fue utilizado para medir la incorporación de BrdU al ADN de nueva síntesis. Las barras representan la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes, realizando cada experimento por duplicado (**p ≤ 0,01) (B) Células recuperadas tras 5 días de cultivo fueron teñidas con Anexina V y Ioduro de propidio (IP) para la determinación de la viabilidad celular, definiéndose como apoptóticas aquellas células Anexina V⁺IP⁻. Los histogramas son representativos de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos indicaban que BMP4 podría participar mediante la regulación de ambos procesos en la diferenciación de las células NK, como ocurre en numerosos sistemas²⁰⁸, puesto que la inhibición de la vía de señalización conllevaba, en los primeros días de cultivo,

una disminución significativa de la proliferación de estas células en comparación con aquella observada en los cultivos control (Figura 19A). Del mismo modo, BMP4 parece jugar un papel fundamental en la viabilidad de las células NK durante su diferenciación, puesto que el número de células apoptóticas fue 5 veces superior en aquellos cultivos donde la vía de señalización BMP4 se había bloqueado (Figura 19B).

1.6.4 BMP4 es necesario para la adquisición de las propiedades funcionales de las células NK

Los resultados mostrados hasta el momento sugerían un papel de la vía canónica de señalización BMP en la diferenciación de estas células puesto que el bloqueo de la ruta provocaba importantes cambios. Sin embargo, aún en presencia de dorsomorfina, algunos precursores lograban alcanzar estadios de diferenciación fenotípicamente más avanzados. Por lo que nuestro siguiente objetivo fue determinar si estas células CD161⁺CD56⁺ diferenciadas en presencia del inhibidor presentaban diferentes capacidades funcionales respecto a los cultivos control. Para ello, llevamos a cabo ensayos funcionales con las células NK generadas en los cultivos, en presencia o ausencia de dorsomorfina, y en igualdad de número de células viables. Tras 12 horas de activación con IL-12 e IL-15 analizamos la capacidad citolítica de estas células frente a la línea tumoral K562. A diferencia de las células que habían diferenciado bajo condiciones control, la células NK diferenciadas en presencia de dorsomorfina exhibían una actividad citotóxica significativamente reducida (Figura 20A). Asimismo, se estudió la capacidad de producción de distintas citoquinas por parte de estas células, y de nuevo las células diferenciadas en presencia de dorsomorfina mostraban una producción significativamente menor tanto de INF γ como de TNF α e IL-10 (Figura 20B).

Por consiguiente, la vía de señalización BMP sería requerida, no sólo durante la diferenciación, sino también para la adquisición de las capacidades funcionales de las células NK.

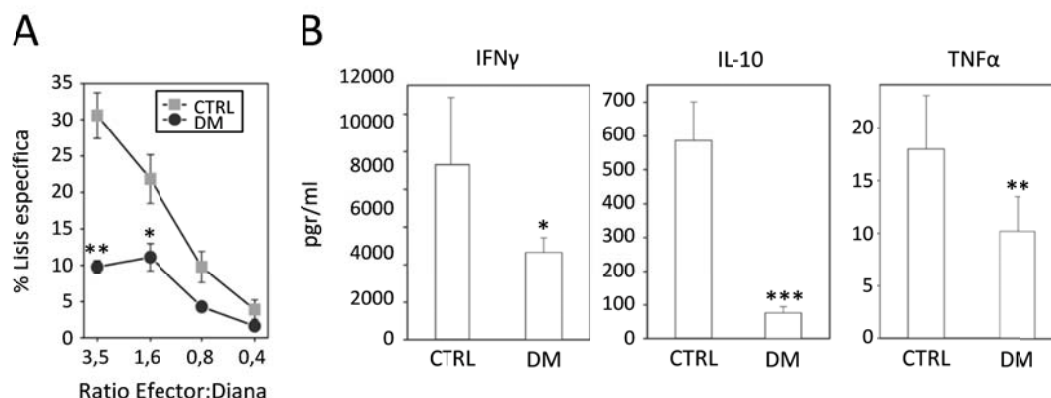


Figura 20. Efecto del bloqueo de la señalización BMP en la adquisición de las capacidades funcionales de las células NK. Células NK, generadas en cultivo a partir de progenitores tímicos $CD34^+CD1a^-BMPRIA^-$, en presencia de IL-15 y SCF, no tratados (CTRL) o tratados con DM (5 μ M), fueron estimuladas durante 12 horas con IL-12 (10ng/ml) + IL-15 (100ng/ml). (A) Se analizó la capacidad citolítica de las células NK tras 4 horas de co-cultivo con la línea tumoral K562, mediante un ensayo de citotoxicidad basado en la medida de la actividad de la enzima LDH. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de lisis específica de distintos ratios célula efectora:célula diana, de 6 experimentos independientes. Todos los experimentos se llevaron a cabo en igualdad de número de células viables. (B) Sobrenadantes de las células NK tras activación con IL-12 + IL-15 fueron recogidos y se emplearon para la determinación de IFN γ , IL-10 y TNF α por ELISA. Las gráficas muestran la producción media \pm desviación estándar, de 6 experimentos independientes, de diferentes citoquinas producidas tras activación de células NK generadas en ausencia o en presencia de DM (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$)

1.7 BMP4 e IL-15 cooperan en la diferenciación de las células NK intratímicas

1.7.1 IL-15 promueve la señalización BMP durante la diferenciación de células NK intratímicas

Como se ha mencionado anteriormente, muchos trabajos han descrito la importancia de IL-15 en la diferenciación de las células NK en diferentes órganos²¹ y nuestros resultados sugieren una posible interacción entre IL-15 y BMP4 en la generación de este linaje en timo humano. Como primer paso para el estudio de esta posible interacción, analizamos el efecto de IL-15 sobre la vía de señalización BMP a nivel de diferenciación estableciendo cultivos tratados con dosis crecientes de IL-15 (desde 1ng/ml hasta 100 ng/ml). Como se muestra en la Figura 21A, observamos una regulación positiva dosis dependiente de la expresión de BMPRIA. Así cuanto mayor era la dosis de IL-15, un mayor porcentaje de células NK en diferenciación expresaban el receptor. Del mismo modo, la secreción de BMP4 se incrementaba notablemente en el medio con la dosis más alta de la citoquina (Figura 21B). Estos datos indicaban que no sólo BMP podría estar mediando en parte los efectos inducidos por IL-15 en proliferación y supervivencia (Figura 19A/B), sino que también IL-15 podría promover la señalización BMP (Figura 21A/B), por lo que aparentemente ambos factores cooperarían en la diferenciación de las células NK a partir de precursores tímicos.

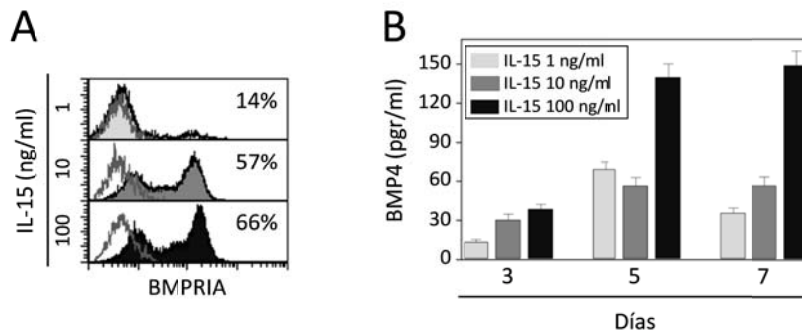


Figura 21. IL-15 promueve la señalización BMP durante la diferenciación de las células NK intratímicas. Precursores $CD34^+ CD1a^- BMPRIA^-$ fueron cultivados en presencia de SCF (100ng/ml) y dosis crecientes de IL-15. (A) Tras 7 días de cultivo se analizó por citometría de flujo la expresión de BMPRIA en las células NK generadas en los distintos cultivos. En cada histograma se muestran los porcentajes de células positivas. (B) Determinación por ELISA de los niveles de BMP4 presentes en los sobrenadantes de estos cultivos recuperados en los tiempos indicados. Los datos presentados son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes.

1.7.2 BMP4 actúa en estadios tempranos de la diferenciación de NK intratímicas

Puesto que los resultados anteriores sugerían la implicación de la ruta de señalización BMP desde los primeros momentos de la diferenciación, nos planteamos a continuación si BMP4 podría suplir a IL-15 en la diferenciación intratímica de estas células. Para ello cultivamos precursores intratímicos con SCF y en ausencia o en presencia de BMP4 y/o IL-15. Como se observa en la Figura 22, si bien IL-15 era necesaria en la diferenciación de las células NK intratímicas, puesto que en ausencia de la misma no recuperábamos células NK maduras, la presencia de BMP4 permitió la diferenciación de un número, aunque reducido, de células NK inmaduras $CD161^+ CD56^-$ (Figura 22). Estos resultados podrían estar indicando un papel de la ruta de señalización BMP4 previo al de IL-15 en la diferenciación de estas células. En este sentido, la estimulación de la señalización BMP provocaba, a corto plazo, un aumento en la capacidad de estas células para responder a IL-15, puesto que la expresión de $CD122/IL-15R\beta$ era mucho mayor en aquellos cultivos tratados con BMP4 (Figura 23A).

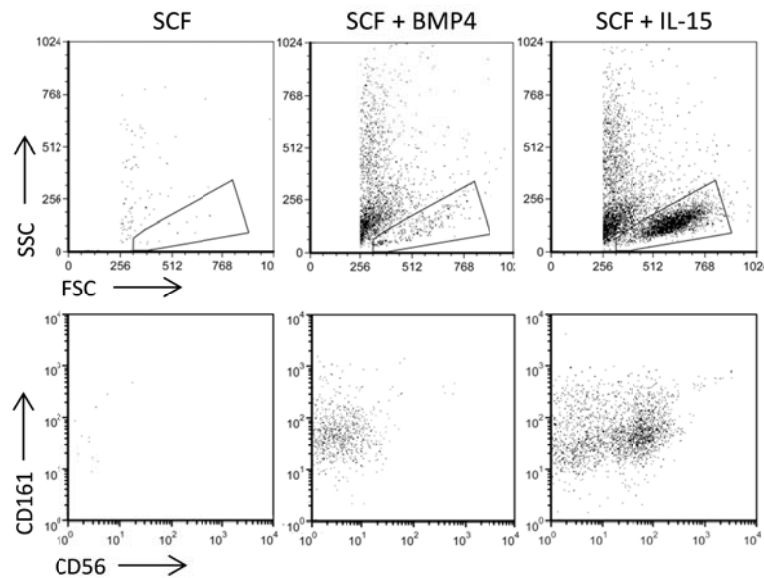


Figura 22. Diferenciación de células NK en presencia y ausencia de BMP4 y/o IL-15. Progenitores intratímicos $CD34^+ CD1a^- BMPRIA^-$ fueron cultivados con SCF (100ng/ml), SCF+BMP4 (50ng/ml) y SCF+IL-15 (100ng/ml) durante 6 días. Se analizó por citometría de flujo las características de tamaño (FSC) y complejidad (SSC), así como la expresión de CD161 y CD56 de las células recuperadas. Los diagramas de puntos mostrados se corresponden con un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Para estudiar los posibles efectos de BMP4 en estadios tempranos de la diferenciación, analizamos a corto plazo, tanto el efecto de BMP4 como el efecto del bloqueo de la vía de señalización, sobre la expresión de distintos genes relacionados con la diferenciación del linaje NK. De esta manera observamos que BMP4 era capaz de regular positivamente los niveles de expresión de factores clave para la diferenciación de las células NK como ID2, RUNX3 y en mayor proporción ID3, mientras la expresión de HES1, implicado en la diferenciación T se veía drásticamente disminuida. Por el contrario, tras la inhibición de la ruta BMP mediante el tratamiento con DM, observamos una notable reducción de la expresión de NFIL3 respecto al control, así como una disminución en los niveles de expresión de ID3, ID2 y RUNX3 (Figura 23B).

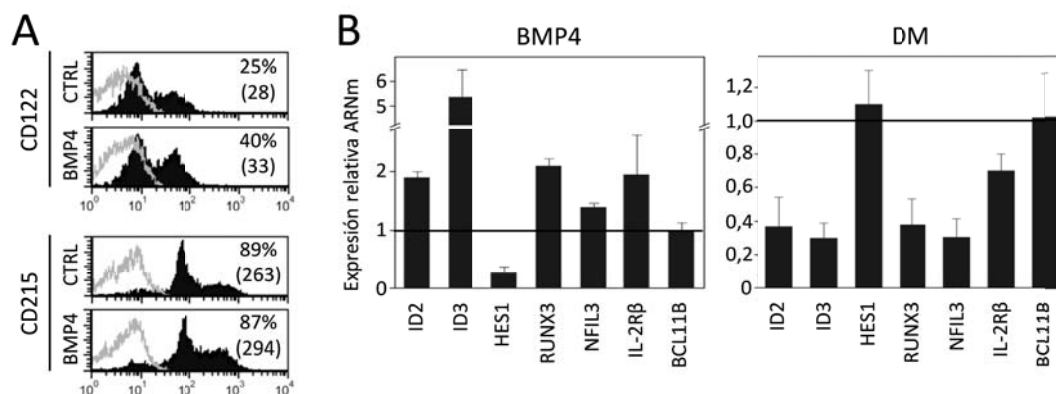


Figura 23. Efecto de BMP4 y DM en los primeros días de la diferenciación NK intratímica. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD122 y CD215 en precursores tímicos tras tratamiento con SCF (100ng/ml) y BMP4 (50ng/ml) durante 36 horas. Los porcentajes de células positivas y la intensidad media de fluorescencia están indicados en cada histograma. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos individuales. (B) Progenitores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ fueron tratados durante 1 hora con o sin BMP4 (50ng/ml) tras 36 horas de cultivo con IL-15 (100ng/ml) + SCF (100ng/ml) (gráfica BMP4) o en presencia o ausencia de DM (5 μ M) durante todo el tiempo de cultivo (gráfica DM). Se analizaron los niveles de transcrito de los genes indicados por PCRq. La expresión de los distintos genes fue normalizada frente a la de GNB2L1. Se muestra la media \pm desviación estándar (2-3 experimentos) de la expresión de los diferentes genes tras los tratamientos con BMP4 y DM relativa a la expresión obtenida en los cultivos control no tratados.

Por lo tanto, BMP4 actuaría en estadios tempranos de la diferenciación de las células NK intratímicas incrementando primero la sensibilidad de estas células a IL-15 y posteriormente, en colaboración con la citoquina, tendría un papel relevante en la proliferación y viabilidad de los intermedios de diferenciación, siendo además crucial para el desarrollo de las capacidades funcionales de las células NK maduras.

2. ESTADIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES DE LA DIFERENCIACIÓN INTRATÍMICA DE CÉLULAS NK

Una vez demostrada la implicación de la vía de señalización BMP en la diferenciación de células NK a partir de progenitores tímicos humanos, nuestro siguiente objetivo fue determinar la presencia de células NK maduras en la glándula tímica, estudiar su localización y realizar un estudio detallado de sus características fenotípicas y funcionales adentrándonos en el estudio del posible papel que desempeñan estas células NK en el timo humano.

2.1 Las células NK intratímicas se localizan principalmente en el compartimento medular

Para analizar la distribución espacial de las células NK en el timo humano, realizamos dobles marcajes sobre crio secciones con anticuerpos dirigidos contra las moléculas CD3 y CD56. Las imágenes de inmunofluorescencia mostraban una localización medular, y más concretamente fue en el límite cortico-medular donde se hallaban el mayor número de células NK, $CD56^{+}CD3^{-}$. Sólo de manera excepcional y en algunas muestras encontramos células NK en el compartimento cortical (Figura 24).

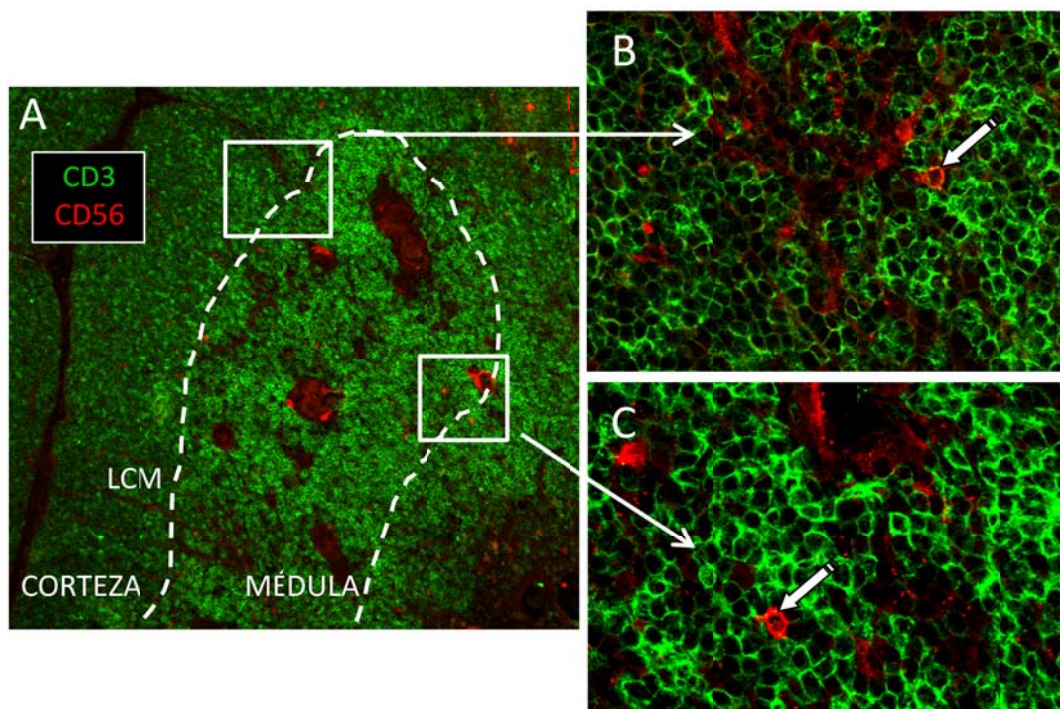


Figura 24. Localización de las células NK en la glándula tímica. Crio secciones de timo fueron teñidas con anti-CD3 (verde) y anti-CD56 (rojo). (A) Panorámica de un lóbulo tímico. La línea punteada indica el límite corticomedular (LCM). B y C detalles correspondientes a las zonas recuadradas de la imagen A. Las flechas indican células NK $CD56^{+}CD3^{-}$.

2.2 Distintos estadios de diferenciación de las células NK están presentes en el timo humano

Dado que éramos capaces de identificar, basándonos en la expresión de CD161 y CD56, distintos estadios de diferenciación en la generación *in vitro* de células NK a partir de precursores intratímicos, nos planteamos estudiar si dichos estadios de diferenciación estaban también presentes en la glándula tímica *in vivo*. Para ello, como primera aproximación, analizamos por citometría de flujo la presencia *ex vivo* de células CD56⁺CD3⁻ en la población tímica; de esta manera, identificamos dos poblaciones de células NK de acuerdo con la intensidad de expresión del marcador CD56 (Figura 25A), expresando ambas subpoblaciones CD161 (Figura 25B).

La caracterización fenotípica indicó que la población que expresaba mayores niveles de CD56 presentaba características de células NK maduras, puesto que expresaban marcadores de células NK típicos de estadios de diferenciación más avanzados (de forma similar a lo que ocurría en los ensayos de diferenciación *in vitro*; Figura 15). Como se puede observar en la Figura 25C, estas células expresaban altos niveles de CD94 y distintos receptores activadores, tales como Nkp46, Nkp30, NKG2D y CD16, además de receptores KIR inhibidores. La expresión de estos marcadores era notablemente menor en la población con nivel de expresión de CD56 más bajo, por lo que estas células podrían corresponderse con un estadio más inmaduro de diferenciación. En la misma línea, confirmando la naturaleza inmadura de estas células, la expresión de granzima y perforina fue notablemente menor que en las células NK maduras, es decir, con mayor expresión de CD56 (Figura 25D).

Por otro lado, y dado que en periferia las células NK CD56^{dim}CD94^{dim} se consideran el estadio terminal de diferenciación⁶¹, cabría plantearse que una proporción de las células NK intratímicas con este fenotipo correspondiera a células NK periféricas recirculantes. Sin embargo, descartamos esta posibilidad dado que las células con una baja expresión tanto de CD56 como de CD94 presentes en el timo humano son mayoritariamente negativas para los marcadores Nkp46, Nkp30, KIR2DL2/L3 o KIR3DL1, y expresaban prácticamente en su totalidad CD117. También, y a diferencia de la población periférica, la expresión del marcador de diferenciación terminal de las células NK periféricas CD57^{59,60} fue indetectable en las subpoblaciones de células NK intratímicas (Figura 25C).

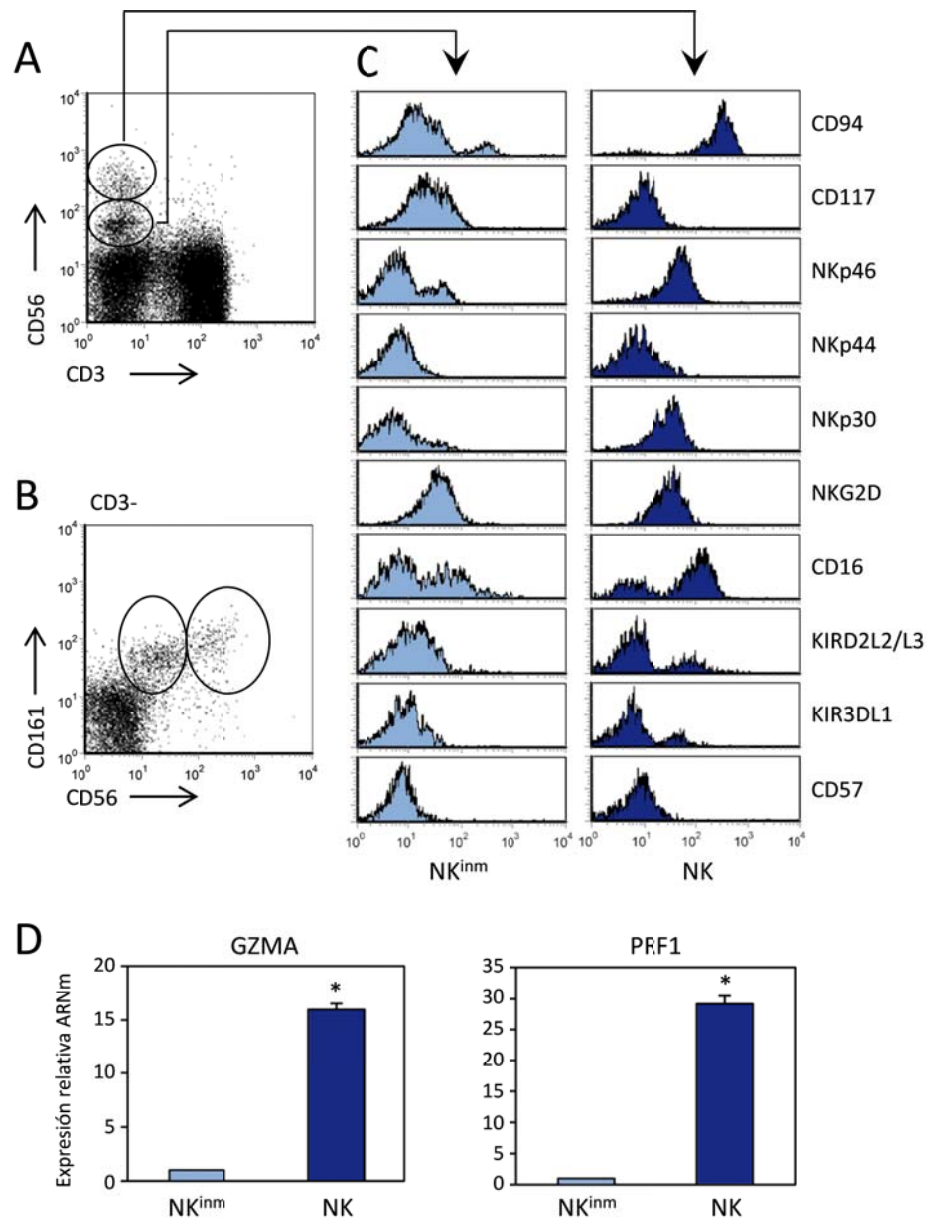


Figura 25. Análisis ex vivo de la expresión de marcadores relacionados con la diferenciación de células NK. (A-C) Estudio fenotípico por citometría de flujo de la expresión de los marcadores arriba indicados en las subpoblaciones intratímicas de células NK inmaduras (NK^{imm}) y maduras (NK) definidas de acuerdo con la expresión de CD56. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. (D) Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de transcripción de Granzima (GZMA) y Perforina (PRF1) en células NK inmaduras y maduras previamente sorteadas. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. La expresión de las células NK está referida a la expresión de las células NK^{imm} . Las gráficas representan la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes. (* $p \leq 0,05$)

2.3 Estadios intermedios de diferenciación de células NK presentes en timo y en ganglios linfáticos son sensibles a BMP4

Con el fin de determinar si la expresión de BMPRIA mantenía *ex vivo* una cinética similar a la descrita durante la diferenciación *in vitro* a partir de precursores $CD34^+CD1a^-BMPRIA^-$

(Figura 15), estudiamos la expresión del receptor en las subpoblaciones de células NK intratímicas descritas en el apartado anterior. Nuevamente observamos que la expresión de BMPRIA se asociaba mayoritariamente a la población de células inmaduras, mientras que se producía una disminución de la expresión del receptor en el estadio de diferenciación más avanzado (Figura 26A).

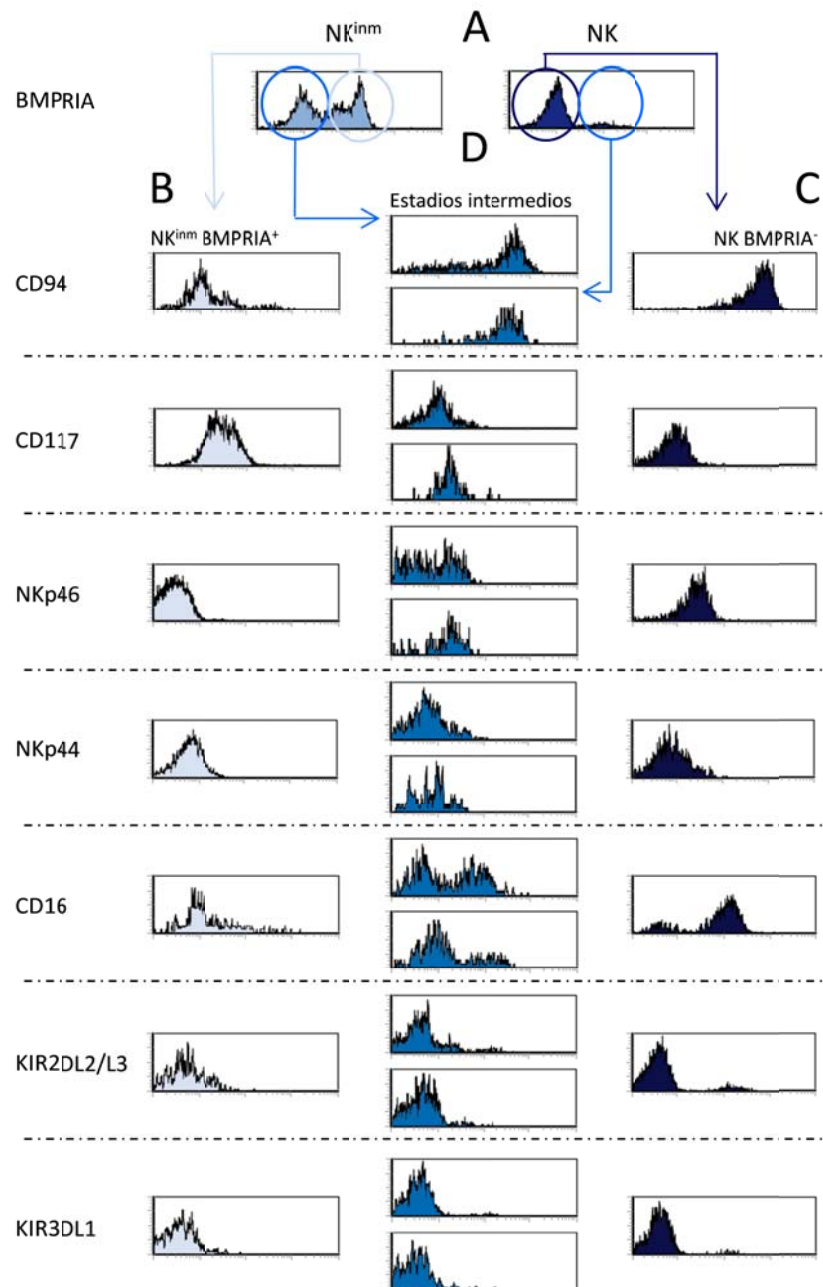


Figura 26. Análisis ex vivo de la diferenciación intratímica de las células NK. Análisis por citometría de flujo de distintos receptores en diferentes subpoblaciones de células NK intratímicas, definidas de acuerdo con la expresión de los marcadores BMPRIA, CD56 y CD3. (A) Expresión de BMPRIA en células NK inmaduras (NK^{imm}) y maduras (NK). Expresión de los distintos marcadores en células NK^{imm} BMPRIA⁺ (B), en células NK^{imm} BMPRIA⁻ (histograma superior) y en células NK BMPRIA⁺ (histograma inferior) (D), y en células NK BMPRIA⁻ (C). Se observa la modulación de la expresión de estos receptores en la secuencia de diferenciación de las células NK intratímicas. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes.

En línea con los resultados anteriores, el estudio de las diferentes subpoblaciones definidas ahora basándonos en la expresión de BMPRIA y CD56 reveló que las células NK inmaduras BMPRIA⁺ apenas expresaban ninguno de los receptores de activación o inhibición ligados a estadios avanzados de diferenciación (Figura 26B), mientras que las células NK maduras que no expresaban BMPRIA presentaban altos niveles de dichos receptores (Figura 26C). De la misma forma, el análisis de la expresión de estos marcadores en las subpoblaciones minoritarias, células con una menor expresión de CD56 que expresan BMPRIA y células con alta expresión de CD56 pero que no expresan BMPRIA, indicó que éstas presentaban niveles de expresión intermedios entre los anteriores (Figura 26D). Estos resultados podrían indicar que la transición desde células NK inmaduras a células NK maduras podría tener lugar a través de dos estadios de diferenciación intermedios; un estadio que expresaría aún niveles bajos de CD56 pero que habría perdido la expresión de BMPRIA, y otro estadio, en el que habría ya una mayor expresión de CD56 y se mantendría la expresión del receptor para BMP.

Por otro lado, en el año 2006 Freud y colaboradores definieron 4 estadios discretos de diferenciación de células NK en ganglios linfáticos humanos en función de la expresión de CD34, CD117 y CD94⁴³. Con el fin de correlacionar con nuestros resultados, estudiamos la expresión de BMPRIA en los distintos estadios de diferenciación de células NK en el timo de acuerdo con la expresión de estos marcadores. En concordancia con los resultados anteriormente mostrados, las células en el estadio intermedio 3 expresaban mayoritariamente BMPRIA, disminuyendo los niveles de expresión del receptor a medida que adquirían un fenotipo maduro (Figura 27).

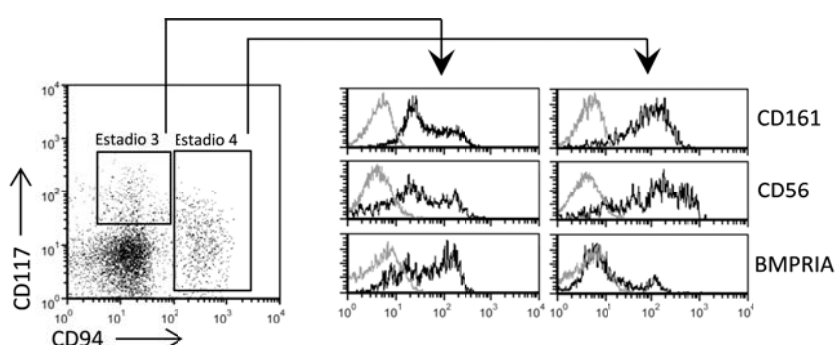


Figura 27. Expresión de BMPRIA en los estadios 3 y 4 de diferenciación de células NK intratímicas. Análisis fenotípico por citometría de flujo de los estadios 3 y 4 de diferenciación de células NK, atendiendo a la expresión de CD117 y CD94. Los histogramas muestran los perfiles de expresión de CD161, CD56 y BMPRIA en el estadio 3 definido como $CD34^-CD3^-CD117^+CD94^-$ y el estadio 4 definido como $CD34^-CD3^-CD117^{+/-}CD94^+$. Se muestra un experimento representativo de 3 analizados.

Asimismo, con el fin de evaluar si, como en el timo, la diferenciación de las células NK en ganglio pasa por un estadio sensible a BMP, analizamos la expresión de BMPRIA en los diferentes estadios de diferenciación de las células NK presentes en ganglio linfático. Una alta proporción de las células del estadio 2, pre-NK, expresaban BMPRIA en comparación con el estadio 1, pro-NK (Figura 28A). Además, esta expresión se mantenía en las células NK inmaduras o estadio 3, y disminuía de forma análoga al timo, en las células NK maduras, o estadio 4 de diferenciación (Figura 28B). Estos resultados sugieren por tanto, que el requerimiento de la señal BMP durante la diferenciación de las células NK no es exclusivo del timo, sino más bien, podría ser un requisito para la diferenciación de este linaje.

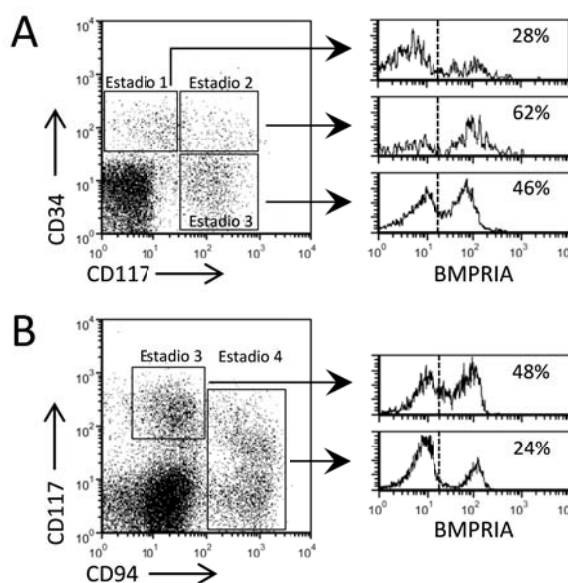


Figura 28. Expresión de BMPRIA en precursores de ganglio linfático. Análisis multiparamétrico por citometría de flujo de la expresión de BMPRIA en los diferentes estadios de diferenciación de células NK en ganglio linfático. (A) Estadios 1-3 definidos en células Lin⁻ (CD3,CD19,CD14 y CD94), de acuerdo a la expresión de CD34 y CD117. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para BMPRIA de cada estadio. (B) Estadios 3 y 4 definidos en células Lin⁻ (CD34,CD3,CD19 y CD14), de acuerdo a la expresión de CD117 y CD94. Los histogramas muestran el porcentaje de células BMPRIA⁺ de cada estadio. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

2.4 Las células NK intratímicas podrían constituir una población de células residentes de tejido

Una vez demostrado que las células NK presentes en timo humano son generadas por diferenciación en la glándula, el siguiente paso fue estudiar si esta población abandona el órgano una vez alcanzado un estadio maduro de diferenciación, o por el contrario permanece en el mismo. Para ello, a falta de datos en relación con marcadores específicos de expresión de células NK intratímicas, analizamos en esta población la expresión de distintos marcadores importantes para la emigración de los timocitos maduros²⁵⁰. Como se observa en la Figura 29A, a medida que las células NK alcanzaban un fenotipo maduro aumentaban los niveles de expresión de CD69 y CD44, mientras que disminuía la expresión de CD62L, y de forma más significativa, la de CCR7, CXCR4 o CD49d. Asimismo, no observamos expresión, en ninguno de los estadios de diferenciación analizados, del marcador CD31.

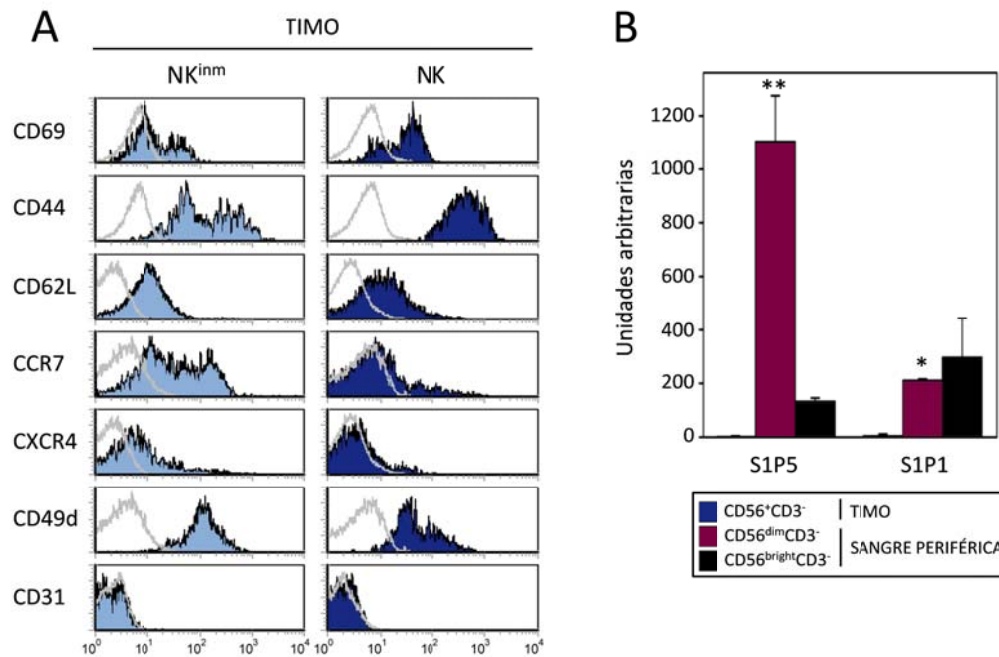


Figura 29. Expresión de marcadores relacionados con la emigración tímica. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de distintos marcadores relacionados con la salida de recientes emigrantes tímicos en células NK inmaduras (NK^{inm}) y maduras (NK) de timo humano, definidas previamente según la expresión de CD56. El histograma gris representa el control de isotipo. Los datos son representativos de 2-4 experimentos independientes. (B) Análisis por PCRq de la expresión de S1P5 y S1P1 en células NK intratímicas maduras sorteadas (CD56⁺CD3⁻) y en células NK CD56^{dim}CD16⁺CD3⁻ y células CD56^{bright}CD16⁻CD3⁻ aisladas mediante separación magnética. Las barras representan la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ Comparación NK intratímicas y poblaciones de sangre periférica)

A continuación comparamos, entre distintas poblaciones de células NK, los niveles de expresión de S1P1 y S1P5, receptores implicados en la salida de linfocitos del timo^{250,251} y de células NK de médula ósea^{252,253} respectivamente. En línea con los resultados anteriores, las células NK intratímicas expresaban bajos niveles, en comparación con células NK de sangre periférica, tanto de S1P1 como de S1P5 (Figura 29B). Por tanto, y en conjunto, estos datos apuntan a que las células NK generadas a partir de precursores intratímicos no abandonan el timo tras alcanzar un estadio maduro de diferenciación.

2.5 Las células NK intratímicas presentan características diferentes de las células NK de sangre periférica

La presencia de una población de células NK que diferenciaban y presumiblemente permanecían en el timo humano, nos llevó a plantearnos la posibilidad de que estas células NK tuvieran características fenotípicas y funcionales particulares, como ocurre en otros órganos^{48,61,112,113}. Por ello, en primer lugar, llevamos a cabo un estudio comparativo del perfil

fenotípico y génico de las células NK intratímicas maduras con las poblaciones de células NK descritas en sangre periférica.

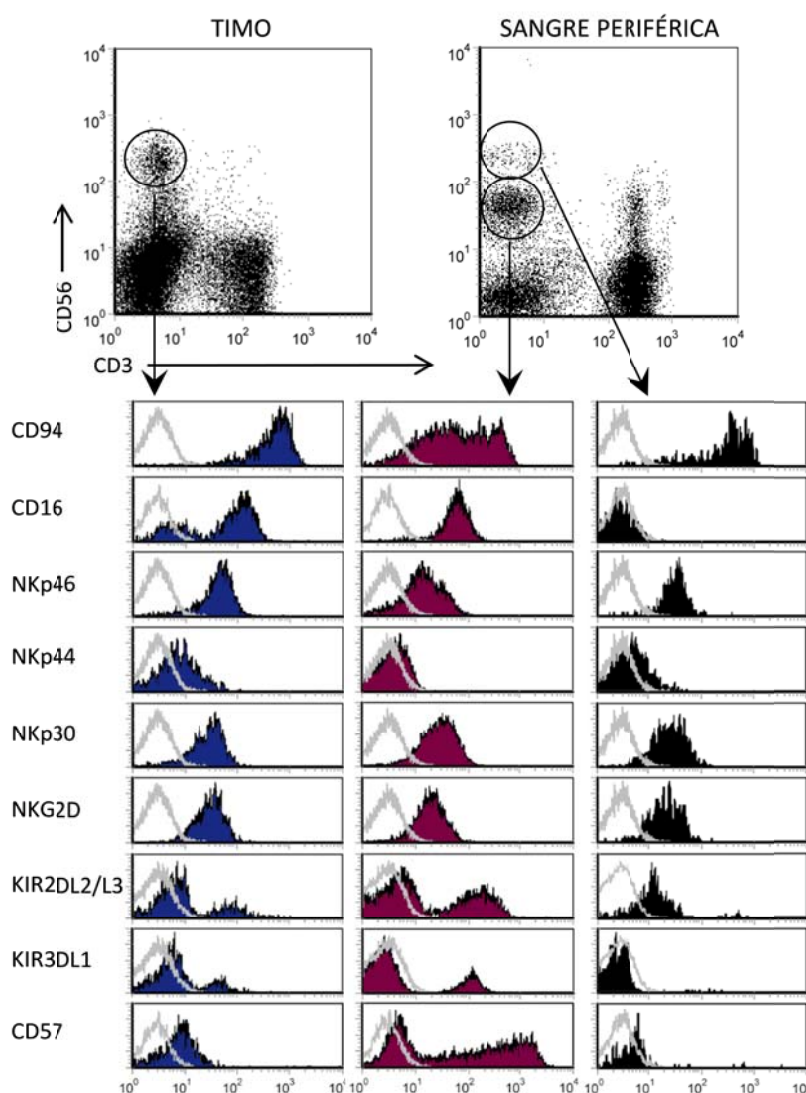


Figura 30. Estudio comparativo del perfil fenotípico de células NK intratímicas y células NK de sangre periférica. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de distintos marcadores en células NK maduras de timo humano (histograma azul) y células NK de sangre periférica, definidas de acuerdo a la expresión de CD56 y CD3, representado los histogramas magenta a la población CD56^{dim}CD3⁻ y los histogramas negros a la población CD56^{bright}CD3⁻. En todos los casos el histograma gris representa el control de isotipo. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

En cuanto a la comparación fenotípica, en las células NK maduras de timo humano la expresión de los marcadores CD56 y CD94 era semejante a la de las células CD56^{bright}CD3⁻ de sangre periférica, mientras que la expresión de CD16 era similar a las células CD56^{dim}CD3⁻ (Figura 30). Como hemos descrito anteriormente (Figura 25C), las células NK de timo expresaban NKG2D y receptores de citotoxicidad (NCRs) característicos como NKp46 y NKp30, de forma similar a las poblaciones periféricas. En relación a los receptores inhibidores, el

patrón de expresión mostrado por las NK intratímicas era semejante al exhibido por las $CD56^{\text{dim}}CD3^-$ (Figura 30). Sin embargo, a diferencia de las células $CD56^{\text{dim}}CD3^-$ de sangre periférica, las células NK intratímicas no expresaban el marcador de maduración CD57. Por otro lado, analizamos la expresión de factores de transcripción claves en la diferenciación del linaje NK en las distintas subpoblaciones. Dentro de la población de células NK intratímicas maduras, la expresión de factores como ID2, GATA-3, ETS1, RUNX3 o TBET era mayor que la expresión de otros factores, entre los que se incluían ID3, GATA2 o RUNX1. El estudio comparativo reveló diferencias en los niveles de expresión de algunos de estos factores entre la población de células NK de timo humano y las poblaciones de sangre periférica. Cabe destacar, que la expresión de GATA3, y en mayor medida RUNX3, era notablemente menor en la población de células NK de timo en comparación con las subpoblaciones periféricas $CD56^{\text{dim}}CD3^-$ y $CD56^{\text{bright}}CD3^-$ (Figura 31).

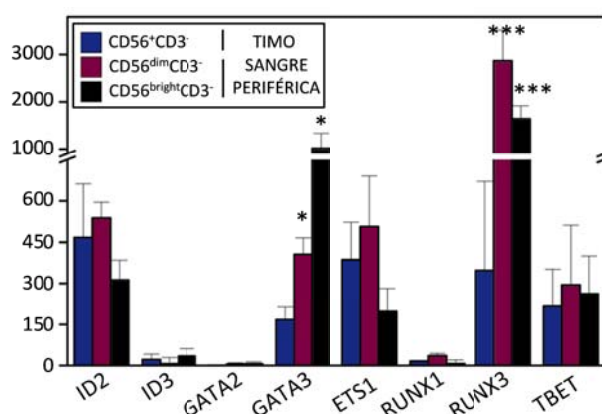


Figura 31. Estudio comparativo del perfil génico de células NK intratímicas y células NK de sangre periférica. Análisis por PCRq de la expresión de distintos factores de transcripción en células NK intratímicas maduras $CD56^+CD3^-$ (barras azules) sorteadas y en células NK $CD56^{\text{dim}}CD16^+CD3^-$ (barras magenta) y células $CD56^{\text{bright}}CD16^+CD3^-$ (barras negras) tras aislamiento mediante separación magnética. Las barras representan la media \pm desviación estándar de la expresión de los distintos genes de al menos 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$)

Asimismo comparamos la expresión de distintos receptores de citoquinas y quimioquinas. Como se puede observar en la Figura 32, no existía una expresión diferencial de los receptores de citoquinas estudiados entre las distintas poblaciones de células NK, siendo mayoritaria en todas las subpoblaciones la expresión de CD122 y CD218/IL-18R α . A diferencia de las células NK intratímicas de ratón⁸⁸, las células NK de timo humano no expresaban mayoritariamente CD127. En cuanto a la expresión de receptores de quimioquinas, a diferencia de las subpoblaciones de sangre periférica, las células NK intratímicas maduras expresaban mayoritariamente CCR2 y CCR5. Mientras que la expresión de CXCR1, CXCR4 o CX3CR1 era notablemente mayor en la subpoblación periférica $CD56^{\text{dim}}CD3^-$.

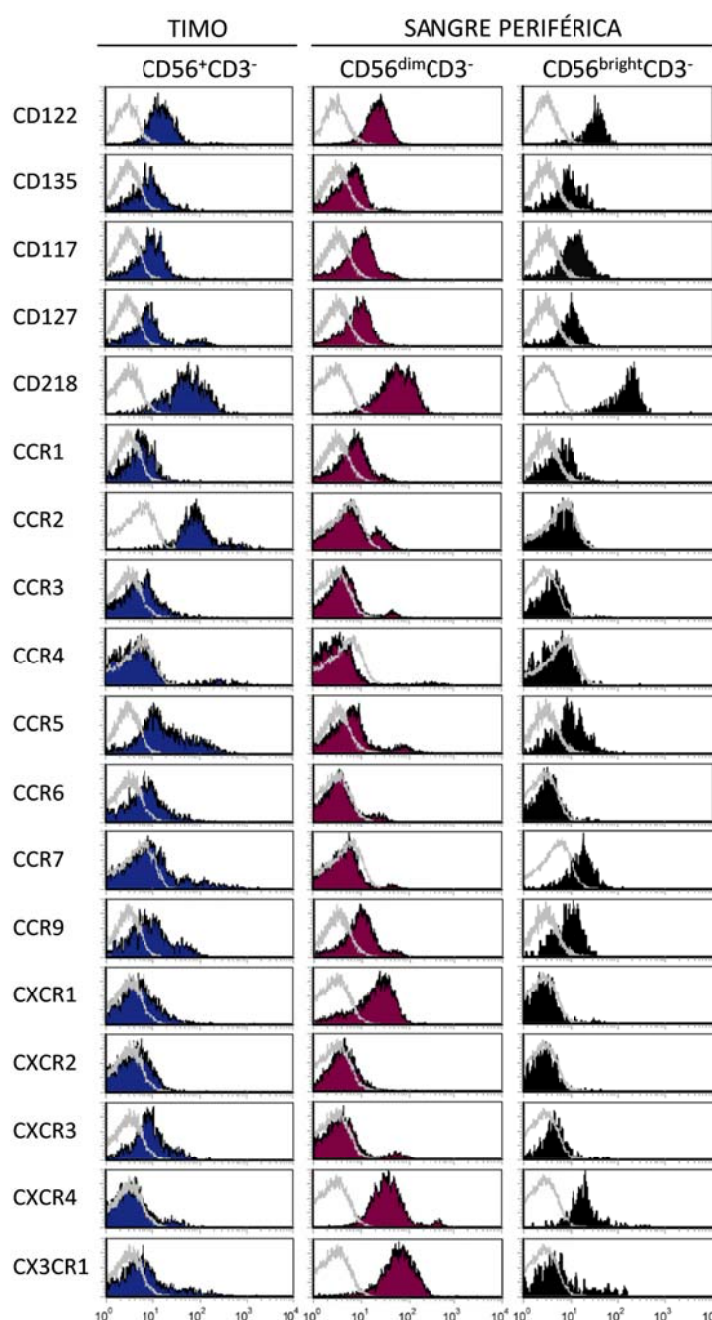


Figura 32. Expresión de receptores de citoquinas y quimioquinas en células NK intratímicas. Comparación con células NK de sangre periférica. Análisis por citometría de flujo de la expresión de los receptores al margen indicados en células NK maduras de timo humano $CD56^{+}CD3^{-}$ (histograma azul) y células NK de sangre periférica. Las poblaciones periféricas fueron definidas de acuerdo a la expresión de $CD56$ y $CD3$, representado los histogramas magenta a la población $CD56^{dim}CD3^{-}$ y los histogramas negros a la población $CD56^{bright}CD3^{-}$. En todos los casos el histograma gris representa el control de isotipo. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

2.6 Las células NK intratímicas expresan basalmente bajos niveles de granzima y perforina

Puesto que las células NK intratímicas maduras presentan características fenotípicas diferentes a las dos subpoblaciones de células NK descritas en sangre periférica, el siguiente paso fue investigar si también existían de partida diferencias en cuanto a las características funcionales.

De esta forma, como una primera aproximación, analizamos por citometría de flujo la expresión basal de granzima y perforina, dos de las proteínas mediadoras de la lisis celular. Así,

de acuerdo a lo descrito ampliamente en la literatura, las células $CD56^{dim}CD3^{-}$ expresaban de forma mayoritaria ambas proteínas, confirmando su perfil citotóxico. Sin embargo, tanto la expresión de granzima como de perforina, era mucho menor en las células NK intratímicas maduras (Figura 33A).

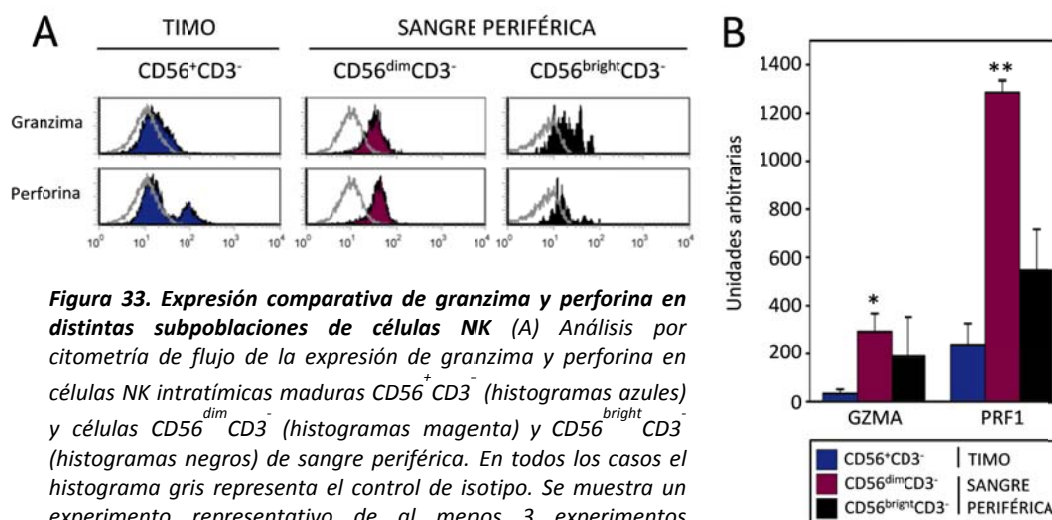


Figura 33. Expresión comparativa de granzima y perforina en distintas subpoblaciones de células NK (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de granzima y perforina en células NK intratímicas maduras $CD56^{+}CD3^{-}$ (histogramas azules) y células $CD56^{dim}CD3^{-}$ (histogramas magenta) y $CD56^{bright}CD3^{-}$ (histogramas negras) de sangre periférica. En todos los casos el histograma gris representa el control de isotipo. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 experimentos independientes. (B) Análisis por PCRq de la expresión de GZMA y PRF1 en células NK intratímicas maduras $CD56^{+}CD3^{-}$ recién sorteadas y en células NK $CD56^{dim}CD16^{+}CD3^{-}$ y células $CD56^{bright}CD16^{+}CD3^{-}$ tras aislamiento mediante separación magnética. Las barras representan la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1.

Con el fin de corroborar estos resultados, comparamos los niveles basales de expresión génica de granzima y de perforina entre las células NK de timo y las dos subpoblaciones de células NK de sangre periférica. De nuevo, la expresión de ambas fue significativamente superior en las células NK de sangre $CD56^{dim}CD3^{-}$ (Figura 33B).

2.7 Tras activación, las células NK intratímicas producen diferentes citoquinas y quimioquinas

Asimismo, analizamos la expresión basal de distintos factores solubles. Los niveles de expresión de CCL5 o CCL3 en las NK intratímicas eran superiores a los niveles alcanzados por otras quimioquinas estudiadas (Figura 34). Sin embargo, esta expresión no parecía ser exclusiva de la población de células NK de timo, puesto que, como se puede apreciar en la Figura 34, los niveles de expresión tanto de CCL5 como de CCL3, eran también mayores en las células $CD56^{dim}CD3^{-}$ y $CD56^{bright}CD3^{-}$ de sangre periférica.

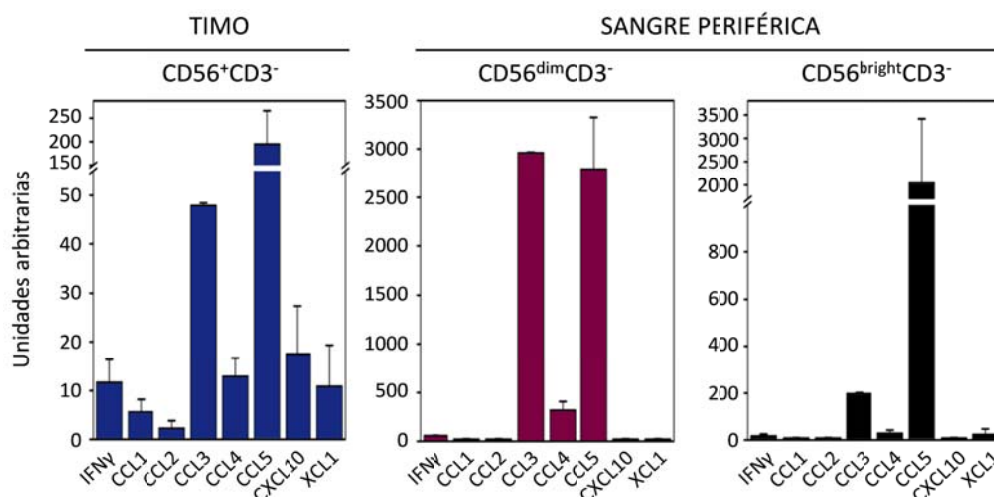


Figura 34. Estudio comparativo de la expresión de factores solubles en distintas subpoblaciones de células NK. Análisis por PCRq de la expresión de los factores arriba indicados en células NK intratímicas maduras CD56⁺CD3⁻ sorteadas (gráfica izquierda) y en células NK de sangre periférica, CD56^{dim}CD16⁺CD3⁻ (gráfica central) y células CD56^{bright}CD16⁻CD3⁻ (gráfica derecha) tras aislamiento mediante separación magnética. Las barras representan la media \pm desviación estándar de 2-5 experimentos independientes. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1.

A continuación, analizamos si se producían cambios en los niveles de expresión de los factores solubles anteriormente estudiados tras activación de las células NK intratímicas, y de nuevo comparamos estos niveles con los exhibidos por las poblaciones de células NK de sangre periférica.

Puesto que para la activación de las células NK se requieren determinados factores que en muchas ocasiones son proporcionados por las DCs^{28,138,139}, elegimos como estímulo de activación la combinación de dos citoquinas clave en la funcionalidad de las células NK como son IL-12 e IL-15. Así, tras 12 horas de estimulación con el coctel de citoquinas, los niveles de expresión de prácticamente todos los factores estudiados se vieron aumentados en las células NK intratímicas activadas. No obstante, existían diferencias en los incrementos de los niveles de expresión de los diferentes factores. La estimulación de esta población provocó un fuerte incremento en los niveles de expresión de IFN γ , así como de otros factores como XCL1, y sobre todo CCL1 y CXCL10, cuya expresión aumentó de manera significativa (Figura 35).

Asimismo, es interesante destacar que en comparación con las subpoblaciones de sangre periférica, los niveles de expresión de CXCL10 tanto de las células NK intratímicas en un estado basal ($x=17,52\pm9,86$) como activadas ($x=505,51\pm143,44$) fueron significativamente superiores a los expresados por ambas subpoblaciones de manera basal (CD56^{dim}CD3⁻ $x=0,00$; CD56^{bright}CD3⁻ $x=0,00$) y tras estimulación (CD56^{dim}CD3⁻ $x=5,92\pm4,1$; CD56^{bright}CD3⁻ $x=37,77\pm10,37$) respectivamente (* $p\leq0,05$).

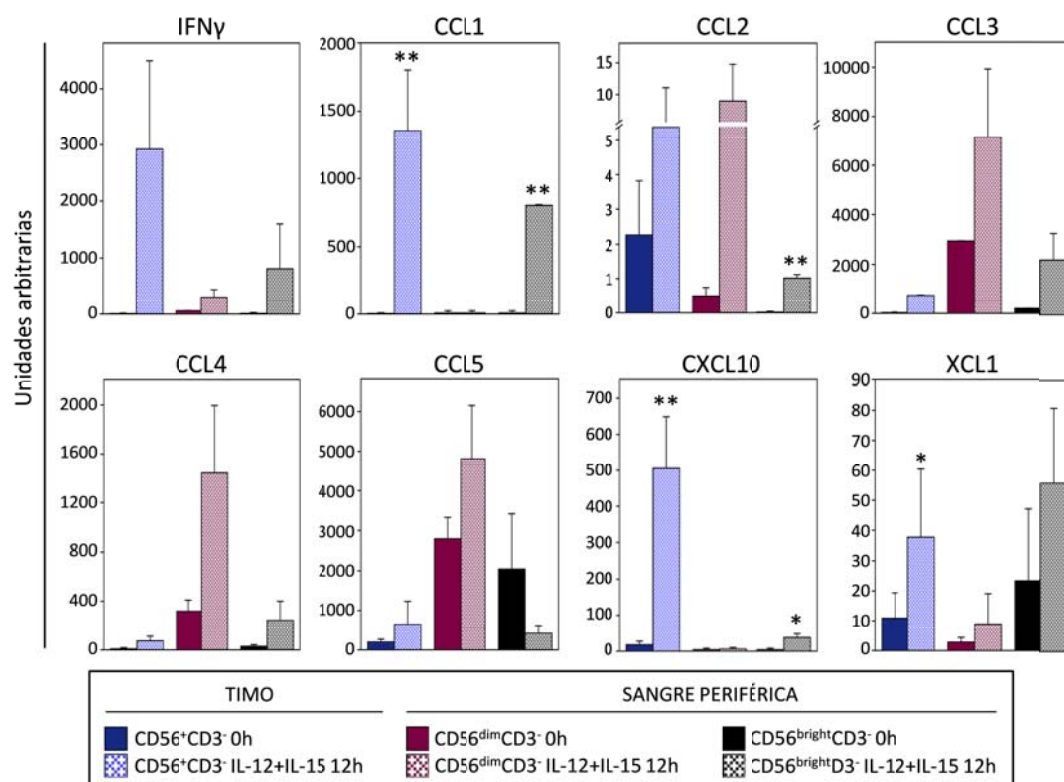


Figura 35. Modulación de la expresión de factores solubles en distintas subpoblaciones de células NK tras activación. Análisis por PCRq de la expresión de los factores arriba indicados en células NK purificadas (barras sin trama) o cultivadas en presencia de IL-12 (10ng/ml) + IL-15 (100ng/ml) durante 12 horas (barras con trama). La población de células NK intratímica CD56⁺CD3⁻ se representa con color azul, mientras que las poblaciones CD56^{dim}CD16⁺CD3⁻ y CD56^{bright}CD16⁺CD3⁻ se representan con color magenta y negro respectivamente. Las barras muestran la media \pm desviación estándar de 2-5 experimentos independientes. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ Comparación 0h y 12h de cada población de células NK)

Por ello, quisimos corroborar, a nivel de proteína, estos resultados estudiando comparativamente la producción de esta quimioquina tras estimulación de las distintas subpoblaciones. Como se puede observar en la Figura 36, la cantidad de CXCL10 producida por las células NK intratímicas activadas era significativamente superior a la producida por las células CD56^{dim}CD3⁻ y CD56^{bright}CD3⁻ de sangre periférica. Estos resultados podrían indicar una característica funcional particular de las células NK intratímicas.

Del mismo modo, analizamos la producción de otras citoquinas y quimioquinas por parte de estas células, siendo especialmente relevante IFN γ dada su importancia funcional. De este modo, los niveles de IFN γ secretados al medio por las células NK intratímicas tras activación fueron significativamente superiores a los producidos por las células CD56^{dim}CD3⁻, pero inferiores a los producidos por las células CD56^{bright}CD3⁻ de sangre periférica, clásicamente definida como principal población de células NK secretoras de dicha citoquina^{13,14} (Figura 36).

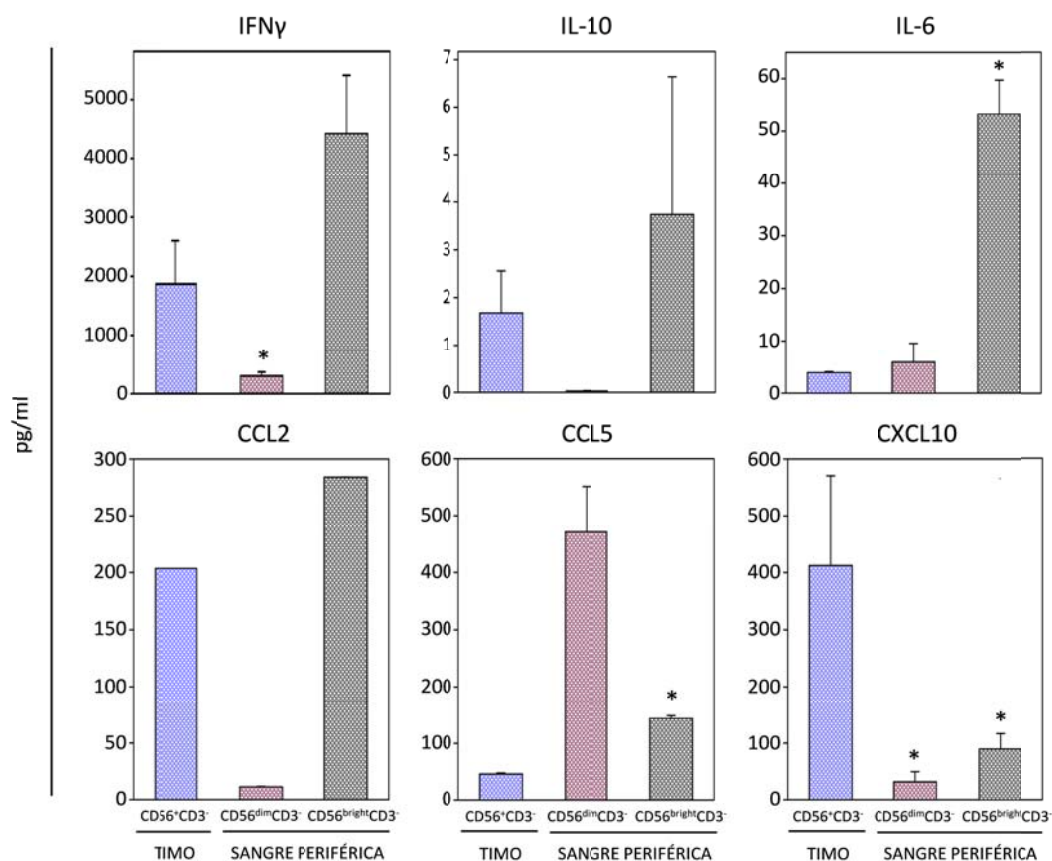


Figura 36. Análisis comparativo de la producción de citoquinas y quimioquinas en distintas subpoblaciones de células NK tras activación. Células NK intratímicas CD56⁺CD3⁻ (azul) y células de sangre periférica CD56^{dim}CD3⁻ (magenta) y CD56^{bright}CD3⁻ (negro) fueron aisladas y cultivadas en presencia de IL-12 (10ng/ml) + IL-15 (100ng/ml). Tras 12 horas de estimulación los sobrenadantes fueron recogidos y se analizó mediante ELISA o CBA la cantidad de IFN γ , IL-10, IL-6, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10. Los datos representan la media \pm desviación estándar de 2-3 experimentos. (* $p \leq 0,05$ Comparación NK intratímicas y poblaciones de sangre periférica)

2.8 Las células NK tímicas presentan una capacidad citotóxica reducida tras estimulación con IL-12 e IL-15

Por otro lado, tal y como se describe en el apartado 2.6, nuestros resultados indicaban que las células NK intratímicas presentaban en condiciones basales una menor expresión de algunos componentes de la maquinaria lítica característica de las células NK. Para ver si efectivamente esta baja expresión se traducía en una menor capacidad citotóxica de estas células, comparamos la actividad lítica contra la línea tumoral K562 de las células NK intratímicas tras 12 horas de activación en presencia de IL-12 e IL-15, con la actividad de las células CD56^{dim}CD3⁻. Como cabría esperar, la capacidad para lisar la línea tumoral por parte de las células NK intratímicas fue muy inferior a la capacidad de las células CD56^{dim}CD3⁻, descritas de manera clásica como la principal subpoblación de células NK citotóxicas (Figura 37).

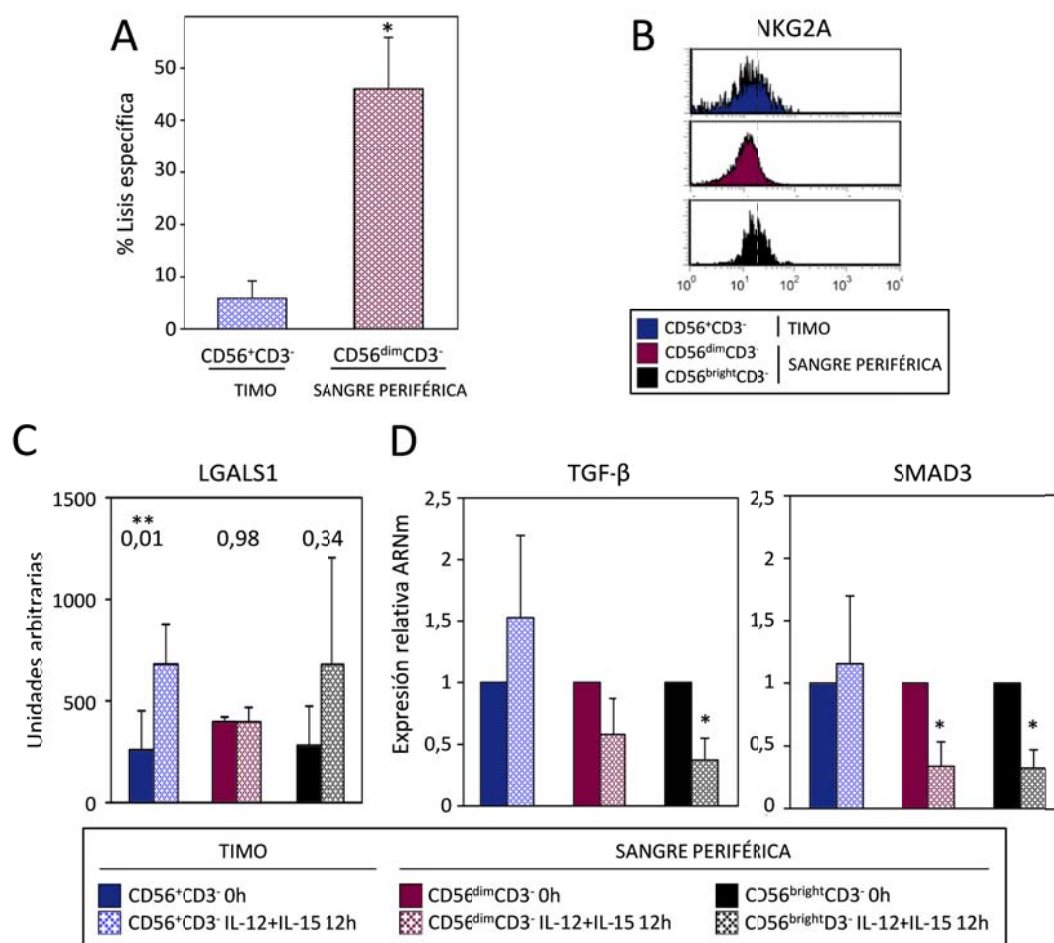


Figura 37. Estudio de la capacidad citotóxica de las células NK intratímicas tras activación. Posibles mecanismos de regulación. (A) Células NK intratímicas CD56⁺CD3⁻ (azul) y células CD56^{dim}CD16⁺CD3⁻ (magenta) de sangre periférica fueron aisladas y cultivadas en presencia de IL-12 (10ng/ml) + IL-15 (100ng/ml). Tras 12 horas de estimulación se determinó la actividad lítica contra la línea tumoral K562 utilizando un ensayo de citotoxicidad LDH. Los datos representan la media del porcentaje de lisis (\pm desviación estándar) de un ratio de 2,5:1 NK:K562, de 3 experimentos independientes. (B) Estudio mediante citometría de flujo de la expresión de NKG2A en células NK maduras de timo (histograma azul) y en células CD56^{dim}CD3⁻ (histograma magenta) y CD56^{bright}CD3⁻ (histograma negro) de sangre periférica. (C y D) Análisis por PCRq de la expresión de los factores arriba indicados en células NK purificadas (barras sin trama) o cultivadas en presencia de IL-12 (10ng/ml) + IL-15 (100ng/ml) durante 12 horas (barras con trama). La población de células NK intratímica CD56⁺CD3⁻ se representa con color azul, mientras que las poblaciones CD56^{dim}CD16⁺CD3⁻ y CD56^{bright}CD16⁺CD3⁻ se representan con color magenta y negro respectivamente. Las barras muestran (C) la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes y (D) la media \pm desviación estándar de la expresión en las células activadas relativa a la expresión basal de cada población de 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ Comparación 0h y 12h de cada población de células NK)

Seguidamente, analizamos la expresión del receptor inhibidor NKG2A, la regulación de la expresión de L-Galectina así como la regulación de la expresión de TGF β y Smad3, todos ellos mecanismos que han sido definidos en otros órganos como los responsables de regular negativamente la capacidad citotóxica de las células NK localizadas en los mismos^{113,254-257}. Así, la expresión de NKG2A fue similar a la exhibida por las células CD56^{bright} de sangre periférica. Asimismo, estudiamos la expresión basal y tras activación de LGALS1, que aumentaba significativamente en las células NK intratímicas estimuladas, contrastando con los resultados

obtenidos en las células NK de sangre periférica. Por el contrario, si bien éstas regulaban negativamente tanto la expresión de TGF β como la de Smad3, esta expresión apenas se modificaba en las células NK del timo cuando eran activadas.

2.9 Las células NK intratímicas expresan receptores tipo Toll (TLRs) y son capaces de responder a este tipo de estimulación

Cada vez son más los trabajos que describen la importancia de la expresión de distintos TLRs en la activación de las células NK²⁵⁸. Por ello, y con el fin de evaluar si la baja actividad citotóxica de las células NK intratímicas era además independiente del estímulo utilizado, analizamos en primer lugar la expresión por PCRq de algunos de los TLRs más característicos. El estudio comparativo con las subpoblaciones de sangre periférica de los niveles de expresión de los TLRs mostró que, exceptuando la expresión de TLR2, las células NK intratímicas expresaban niveles superiores de todos los TLRs estudiados, siendo los niveles de expresión de TLR1 y TLR3 particularmente altos en esta población (Figura 38A).

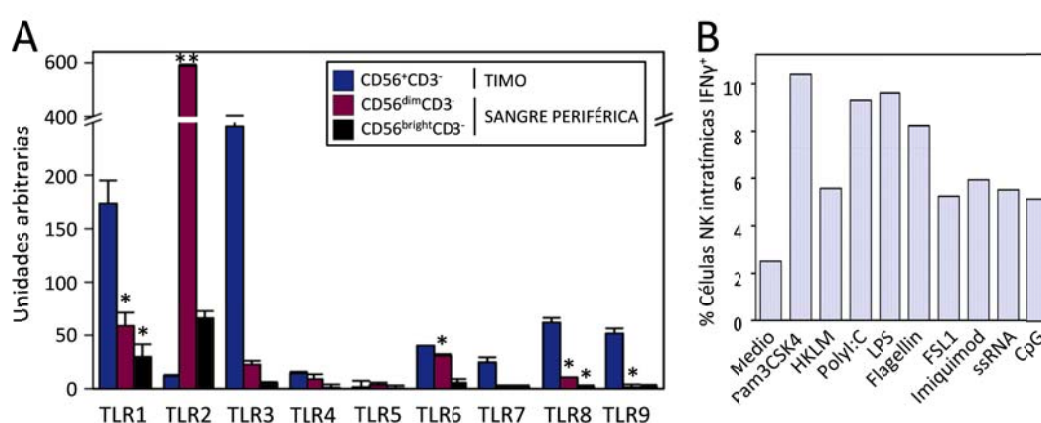


Figura 38. Estudio comparativo de la expresión génica de TLRs de células NK intratímicas y células NK de sangre periférica. (A) Análisis por PCRq de la expresión de distintos TLRs arriba indicados en células NK intratímicas maduras CD56⁺CD3⁻ sorteadas (barras azules) y en células NK CD56^{dim}CD3⁺ (barras magenta) y células CD56^{bright}CD3⁻ (barras negras) tras aislamiento mediante separación magnética. Las barras representan la media \pm desviación estándar de la expresión de los distintos genes de 3 experimentos independientes. Los niveles de expresión génica fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. (B) Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células NK intratímicas IFN γ ⁺, para lo cual, células de la población E- fueron cultivadas durante 16 horas en presencia o ausencia de los siguientes estímulos: Pam3CysSerLys4 (1 μ g/ml), HKLM (10⁷ cél /ml), PolyI:C (12,5 μ g/ml), LPS (100ng/ml), ST Flagellin (200ng/ml), FSL1 (100ng/ml), Imiquinod (1 μ g/ml), ssRNA (1 μ g/ml) y CpG (5 μ g/ml). Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes. (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01 Comparación NK intratímicas y poblaciones de sangre periférica)

El hecho de que las células NK intratímicas expresasen en mayor o menor medida estos receptores podría estar indicando una posible respuesta de activación mediante esta vía. Como una primera aproximación para comprobar que las células NK intratímicas podían responder a este tipo de estímulos, cultivamos células de la población tímica enriquecida en células NK (E-) en presencia de diferentes agonistas de estos receptores, y analizamos

posteriormente por citometría de flujo la expresión de IFN γ en las células NK. En general, las células NK fueron capaces de responder a los distintos agonistas utilizados, sin embargo, la estimulación con Pam3CSK4 (agonista de TLR1), LPS (agonista TLR4), y PolyI:C (agonista de TLR3) conllevó un mayor porcentaje de células NK IFN γ ⁺ en estos cultivos (Figura 38B).

Puesto que este mayor porcentaje de células IFN γ ⁺ podría no deberse sólo a la estimulación directa vía TLR de las células NK, el siguiente paso fue analizar el efecto funcional de este tipo de estimulación en células NK intratímicas purificadas. Dado que la expresión basal de TLR1 y TLR3 era muy superior en esta población y la activación con sus agonistas, Pam3CSK4 y PolyI:C respectivamente, provocó un mayor efecto sobre la expresión de IFN γ , seleccionamos para el estudio estos dos estímulos de activación y los comparamos con la estimulación mediante citoquinas IL-12 e IL-15.

Como describimos anteriormente (apartado 2.8) las células NK intratímicas activadas con IL-12 e IL-15 presentaban una capacidad lítica muy reducida y, aunque los datos de granzima y perforina basales estaban en consonancia, no podíamos descartar que el estímulo de activación elegido no fuera el más adecuado para potenciar este aspecto funcional. Por tanto, en primer lugar comparamos el efecto de los distintos estímulos de activación sobre la capacidad citotóxica de las células NK intratímicas.

Sin embargo, el hecho de utilizar otro tipo de estímulo de activación no potenció la capacidad de las células NK intratímicas para lisar la línea tumoral K562, puesto que la actividad lítica de las células NK estimuladas con Pam3CSK4 y PolyI:C fue incluso inferior a la de las células NK activadas con IL-12 e IL-15 (Figura 39A). Además, la producción de IFN γ por parte de las células NK activadas directamente vía TLR fue nula (Figura 39B).

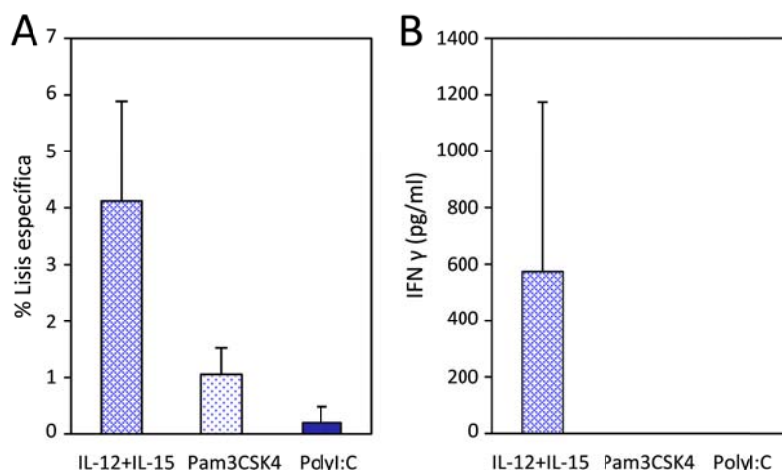


Figura 39. Capacidad citotóxica y producción de IFN γ de células NK intratímicas tras activación con distintos estímulos. Células NK intratímicas maduras CD56⁺ CD3⁻ fueron sorteadas y cultivadas en presencia de IL-12 (10ng/ml) + IL-15 (100ng/ml) (barra izquierda), Pam3CSK4 (1 μ g/ml) o PolyI:C (12,5 μ g/ml). Tras 12 horas de estimulación se determinó (A) la actividad lítica contra la línea tumoral K562 utilizando un ensayo de citotoxicidad LDH, y un ratio de 2,5:1 NK:K562, y (B) la cantidad de IFN γ mediante ELISA. Los datos representan la media de porcentaje de lisis \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes.

Por tanto, nuestros resultados parecen indicar que existen diferentes mecanismos responsables de la reducida actividad citotóxica exhibida por las células NK intratímicas. Sin embargo, estas células son capaces de producir diferentes citoquinas y quimioquinas, de forma diferencial a las poblaciones de sangre periférica, siendo característica la producción de CXCL10 de las células NK intratímicas tras activación con citoquinas.

3. PAPEL DE BMP EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA

Muchos son los trabajos en los que se demuestra la implicación de la ruta de señalización de BMP en distintos tipos de cáncer ²⁵⁹. Dado que las células NK desempeñan un papel fundamental en la respuesta antitumoral y BMP está implicado, al menos, en la generación de células NK intratímicas, el siguiente objetivo del presente trabajo fue extender nuestro estudio al análisis de la implicación de la vía en la funcionalidad de las células NK de sangre periférica.

3.1 Las células NK de sangre periférica expresan tanto receptores como ligandos BMP

En primer lugar analizamos la expresión, mediante PCRq, de los receptores de BMP tipo I y tipo II en distintas poblaciones de sangre periférica. Tanto la población de células NK totales, como las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, expresaban BMPRIA, y en mayor medida BMPRII (Figura 40A). Asimismo, ante la posibilidad de una respuesta autocrina, estudiamos también la expresión de diferentes ligandos BMP en estas células, y observamos que las células NK expresaban BMP2 y BMP6, mientras que no detectábamos expresión ni de BMP4 ni de BMP7 (Figura 40B).

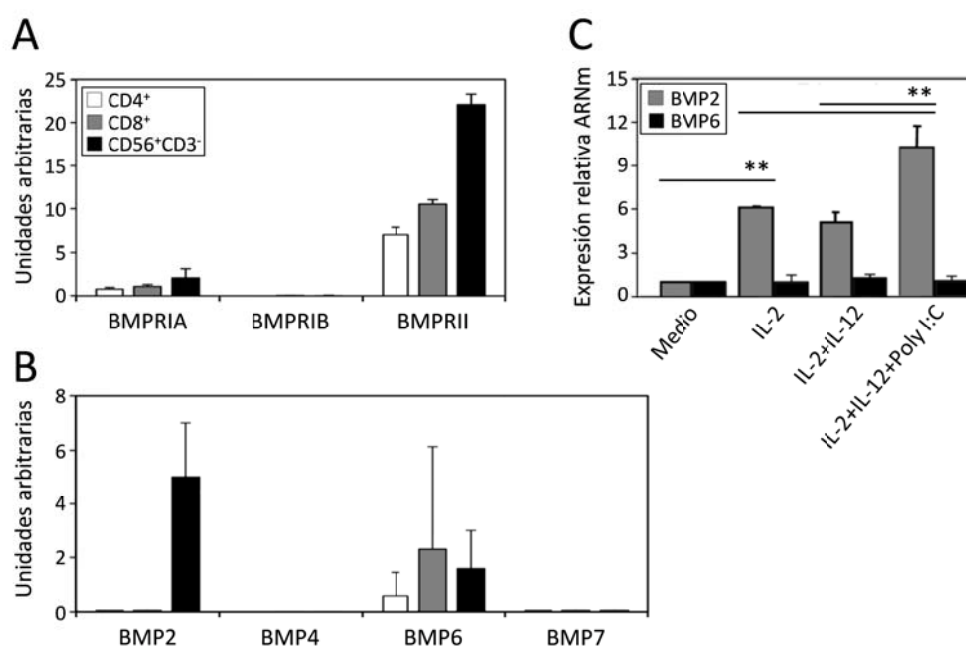


Figura 40. Expresión de receptores y ligandos BMP en células NK de sangre periférica. Análisis por PCRq de la expresión de diferentes receptores (A) y ligandos BMP (B) en células $CD4^+CD3^+$, $CD8^+CD3^+$ y $CD56^+CD3^-$ sorteadas a partir de dos muestras de sangre periférica de diferentes donantes. (C) Células NK totales fueron aisladas, mediante separación magnética, y cultivadas en presencia o ausencia de diferentes estímulos durante 4 horas. La gráfica muestra la expresión relativa a las células cultivadas en ausencia de estímulo de los ligandos BMP2 y BMP6 tras estimulación. (** $p \leq 0,01$)

A continuación, evaluamos si tras estimulación las células NK aumentaban los niveles de expresión de BMP2 y/o BMP6. Tras 4 horas de activación con diferentes estímulos, se producía, en todos los casos, un aumento en los niveles de expresión de BMP2, siendo este incremento observado de hasta 10 veces cuando el cóctel de estimulación no sólo incluía citoquinas como IL-2 e IL-12, sino también un estímulo tipo TLR, como PolyI:C (Figura 40C). Los niveles de BMP6 no se veían en ningún caso afectados (Figura 40C).

El aumento en la capacidad de producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y en la capacidad citotóxica de las células NK por la adición de PolyI:C a la estimulación IL-2 e IL-12, fue descrito por Robson y col ²⁴¹. Este hecho, junto con el gran incremento observado en los niveles de BMP2 en esta situación nos llevó a seleccionar este estímulo de activación, IL-2, IL-12 y PolyI:C para esta parte de nuestro estudio.

3.2 Las células NK periféricas modulan tras activación componentes de la vía de señalización BMP

Puesto que los datos anteriores sugerían que las células NK eran capaces de responder a BMP, el siguiente paso fue analizar la posible modulación de distintos componentes de la vía de señalización en las células NK tras activación. Para ello comparamos los niveles de expresión de receptores y proteínas Smad, así como de diferentes inhibidores de la vía de señalización BMP, en las células NK aisladas de sangre periférica a tiempo 0 y tras 12 y 36 horas de cultivo en presencia de IL-2, IL-12 y PolyI:C. Los resultados obtenidos mostraban un aumento tras activación de los niveles de expresión de los receptores tipo I, así como de una de las proteínas BR-Smad, Smad1, mientras que los niveles de la proteína Co-Smad/Smad4 apenas se veían modificados (Figura 41). Estos cambios eran evidentes tras 12 horas de estimulación, y por lo general, se mantenían en el tiempo. En cuanto a la expresión de componentes inhibidores de la ruta de señalización, los niveles tanto de la proteína Smad Inhibidora/Smad7, como del pseudoreceptor Bambi o del antagonista Noggin, se redujeron notablemente tras activación de las células NK (Figura 41).

En paralelo al incremento de expresión de los componentes activadores de la vía de señalización que acontecía en las células NK tras su estimulación, tenía lugar una drástica reducción de los niveles de TGF β y de una de las R-Smads mediadoras de su señalización, Smad3 (Figura 41).

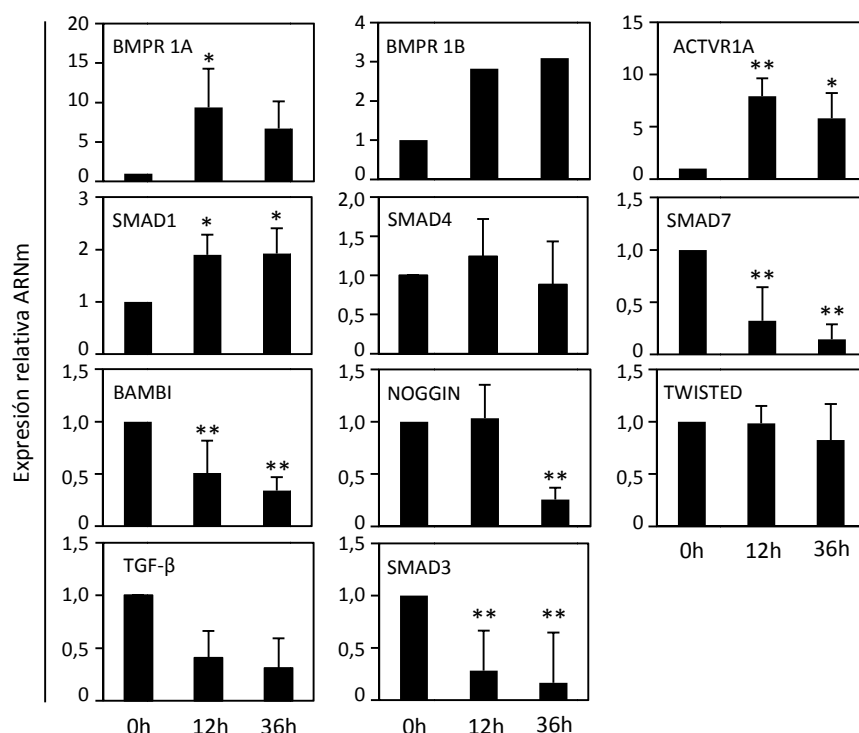


Figura 41. Modulación de la expresión de componentes de la vía de señalización BMP en células NK de sangre periférica tras activación. Análisis por PCRq de la expresión de los genes arriba mostrados en células NK purificadas o cultivadas en presencia de IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5μg/ml) durante 12 y 36 horas. Las gráficas muestran la media (\pm desviación estándar) de expresión de estos genes en las células activadas referida a la expresión a tiempo 0, de 2-6 experimentos independientes. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Comparación 0h y 12 ó 36h)

3.3 La ruta de señalización BMP está activa en las células NK activadas

A continuación evaluamos si la vía canónica de señalización BMP está activa tras estimulación de las células NK. Para ello, estudiamos por citometría de flujo los niveles de Smad-1/5/8 fosforilada en esta población. Como se puede advertir en la Figura 42, los niveles de pSmad 1/5/8 aumentaban de manera muy notable en las células NK cuando eran estimuladas, observando los mayores incrementos tras estimulación durante 36 horas con IL-2, IL-12 y PolyI:C (Figura 42).

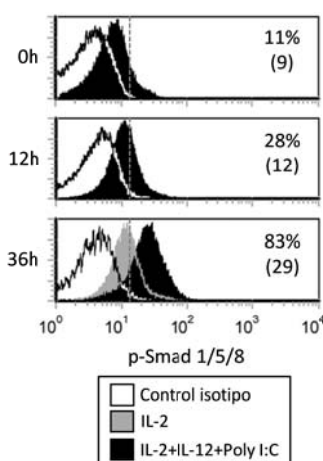


Figura 42. Comparación de los niveles de las proteínas Smad 1/5/8 fosforiladas en células NK tras activación. Niveles de las proteínas Smad-1/5/8 fosforiladas fueron determinados por citometría de flujo en células NK purificadas antes (0h) o después del cultivo en presencia de IL-2 (50ng/ml) (histograma gris) o IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5μg/ml) (histograma negro) en los tiempos indicados. El histograma negro no relleno representa en todos los casos el control de isotipo. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

3.4 DMH1 bloquea la fosforilación de las proteínas BR-Smad

Los resultados obtenidos mostraban la estimulación de la vía canónica de señalización BMP tras activación de las células NK, lo que nos llevó a pensar que la señalización autocrina de BMP podría desempeñar un papel en la activación de estas células. Para estudiar este posible efecto, llevamos a cabo el bloqueo de esta ruta mediante la adición al cultivo de DMH1, un nuevo compuesto inhibidor análogo a la dorsomorfina pero más eficaz que ésta²⁶⁰.

Como se observa en la Figura 43 la adición de DMH1 al cultivo efectivamente impedía la fosforilación de las proteínas Smad-1/5/8. Como cabría esperar, aquellas células NK activadas en presencia de DMH1 (20µM) mostraban niveles de estas proteínas fosforiladas similares a los obtenidos en células NK a las que no se les añadió ningún estímulo de activación. Por el contrario, y como se mostraba en el apartado anterior, las células NK activadas en situación control (en ausencia de inhibidor), presentaban un importante incremento de los niveles de expresión de las proteínas Smad-1/5/8 fosforiladas (Figura 43).

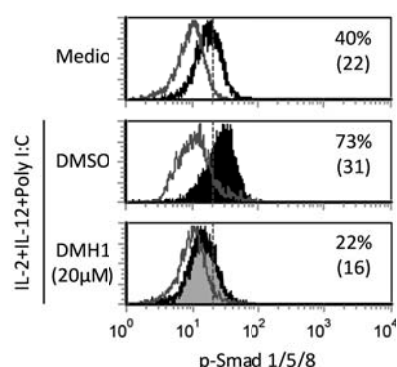


Figura 43. Comparación de los niveles de las proteínas Smad 1/5/8 fosforiladas en células NK activadas tras tratamiento con DMH1. Niveles de las proteínas Smad-1/5/8 fosforiladas fueron determinados por citometría de flujo en células NK purificadas cultivadas durante 12 horas en ausencia de estímulo (medio) o en presencia de IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5µg/ml) + tratamiento con DMH1 o con su vehículo DMSO. El histograma gris no relleno representa en todos los casos el control de isotipo. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

3.5 El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP reduce la proliferación de las células NK sin afectar su viabilidad

Una vez demostrado el punto anterior, el siguiente paso fue investigar el efecto del bloqueo de la ruta canónica de BMP en la activación de las células NK. Para ello llevamos a cabo distintas estrategias, analizando el efecto sobre la supervivencia, la proliferación y distintos aspectos funcionales de las células NK.

La adición de dosis crecientes de DMH1 no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células NK. Como se puede ver en la Figura 44, porcentajes de células apoptóticas similares a los cultivos control, o incluso inferiores a éstos, podían detectarse en los cultivos tratados con el inhibidor, incluso con las dosis más elevadas del mismo.

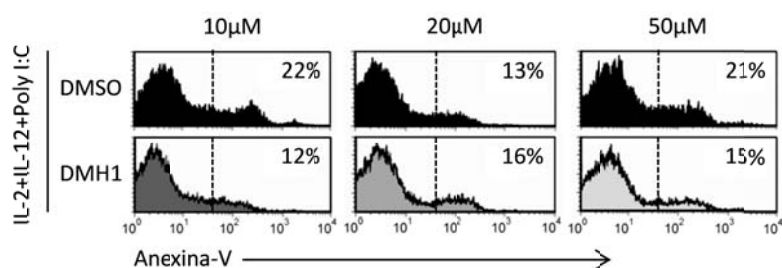


Figura 44. Efecto de DMH1 en la viabilidad de células NK activadas. Células NK de sangre periférica fueron aisladas y estimuladas con IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5μg/ml) en presencia de distintas dosis de DMH1. Tras 12 horas de activación se analizaron los porcentajes de células apoptóticas Anexina⁺IP⁻. Los histogramas muestran un experimento representativo de 7 experimentos independientes.

Asimismo analizamos el efecto de BMP sobre la proliferación de esta población, para lo cual elegimos dos estímulos clásicos de proliferación de células NK como son IL-2 e IL-15²⁶¹. Tras 6 días bajo el efecto de diferentes dosis de estos estímulos y en presencia o ausencia de DMH1, medimos la proliferación en términos de pérdida de CFSE en los distintos cultivos. Aquellas células a las que se les había adicionado DMH1 mostraban una importante reducción de la proliferación en comparación con las células control, reducción que llegaba a ser prácticamente del 50% con cualquiera de los dos estímulos utilizados. Únicamente cuando dosis elevadas de los estímulos proliferativos IL-2 o IL-15 eran añadidos a los cultivos, el bloqueo de la señalización BMP no tuvo ningún impacto sobre la proliferación de las células NK (Figura 45).

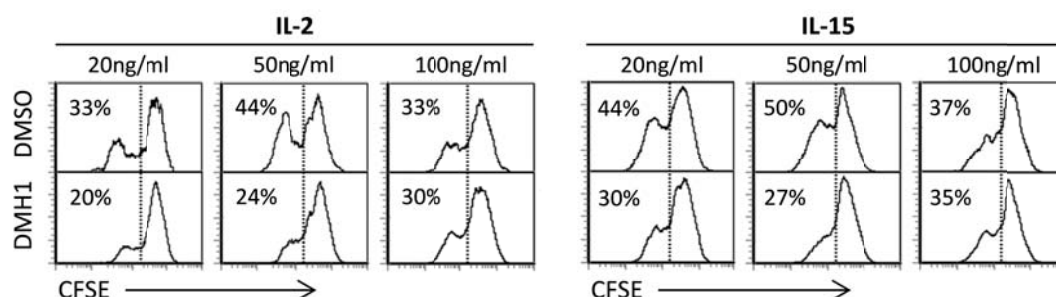


Figura 45. Efecto de DMH1 en la proliferación de células NK estimuladas con IL-2 o IL-15. Células NK fueron aisladas y estimuladas con distintas dosis de IL-2 o IL-15 y tratadas con DMSO o DMH1 durante 6 días. La proliferación celular fue analizada mediante la pérdida de CFSE en los diferentes cultivos. Los histogramas muestran un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Estos datos apuntan un papel autocrino de la señalización BMP en la proliferación inducida de las células NK pero no en el mantenimiento de su viabilidad.

3.6 La señalización BMP es necesaria para la completa funcionalidad de las células NK

3.6.1 El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP disminuye en las células NK activadas su capacidad de producción de citoquinas y quimioquinas

A continuación estudiamos si la señalización BMP participaba en la funcionalidad de estas células. Analizamos, en primer lugar, el efecto del bloqueo de la ruta canónica de BMP sobre la capacidad de producción de IFN γ , observando una disminución significativa, dosis dependiente, cuando se activaban las células NK en presencia de DMH1 (Figura 46A). Estos datos se correlacionaban con la reducción en los niveles de expresión del factor de transcripción clave para la producción de IFN γ , TBET, en los cultivos tratados con DMH1 (Figura 46B).

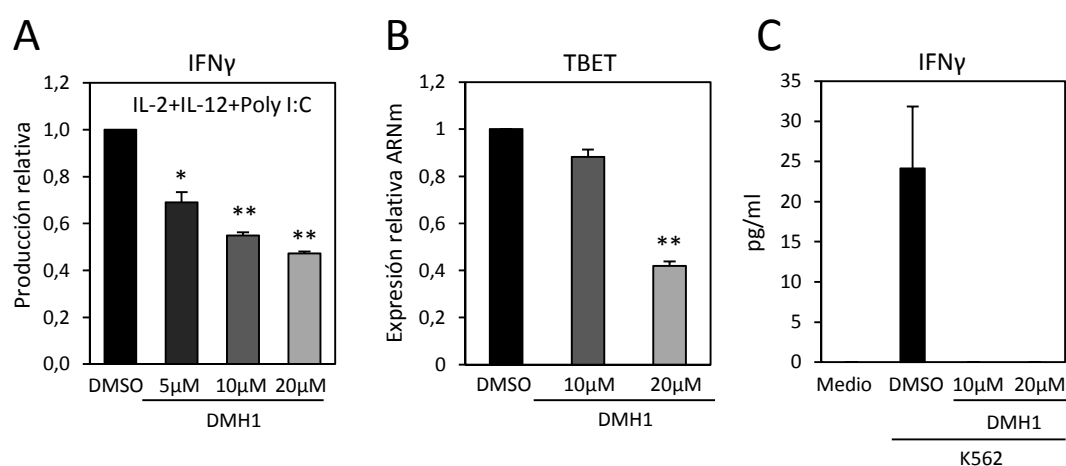


Figura 46. Efecto de DMH1 en la producción de IFN γ . Células NK purificadas fueron estimuladas con IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5 μ g/ml) en ausencia (DMSO) o presencia de concentraciones crecientes de DMH1. Tras 12 horas de activación se analizó mediante ELISA la cantidad de IFN γ en los sobrenadantes de los distintos cultivos (A) así como la expresión por PCRq de TBET en las células NK cultivadas (B). Las gráficas muestran la media (\pm desviación estándar) de 3 experimentos, de la cantidad de IFN γ producida (A) o la expresión de TBET (B) en las células NK tras tratamiento con DMH1, referida a las células NK cultivadas en condiciones control (DMSO). (C) Células NK aisladas fueron cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de la línea tumoral K562, solas (DMSO) o con distintas concentraciones de DMH1. La cantidad de IFN γ secretada en los sobrenadantes fue determinada mediante ELISA. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Comparación DMSO y las distintas dosis de DMH1)

Para conocer si esta reducción de los niveles de IFN γ tras el tratamiento con DMH1 era dependiente del estímulo utilizado, llevamos a cabo ensayos de activación de células NK utilizando la línea tumoral K562. Aunque los niveles de producción de la citoquina en estos cultivos fue mucho menor que en los cultivos anteriores, no fue posible detectar IFN γ en los sobrenadantes de aquellas células que habían sido tratadas con DMH1 durante su activación con la línea tumoral (Figura 46C).

Posteriormente hicimos extensivo el estudio de la inhibición de la vía de señalización BMP a la capacidad de producción de otras citoquinas y quimioquinas de las células NK estimuladas con IL-2, IL-12 y PolyI:C. De este modo, observamos que no sólo los niveles de IFN γ se veían reducidos, sino que también disminuían los niveles de secreción de otras citoquinas proinflamatorias como IL-6 o GM-CSF, o de la citoquina inmunomoduladora IL-10, cuando las células NK eran activadas en presencia de distintas dosis de DMH1. Respecto a la producción de quimioquinas, también observamos una disminución de los niveles de secreción de CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10 y CCL2/MCP-1 cuando comparábamos las células tratadas con DMH1 con las células control (Figura 47).

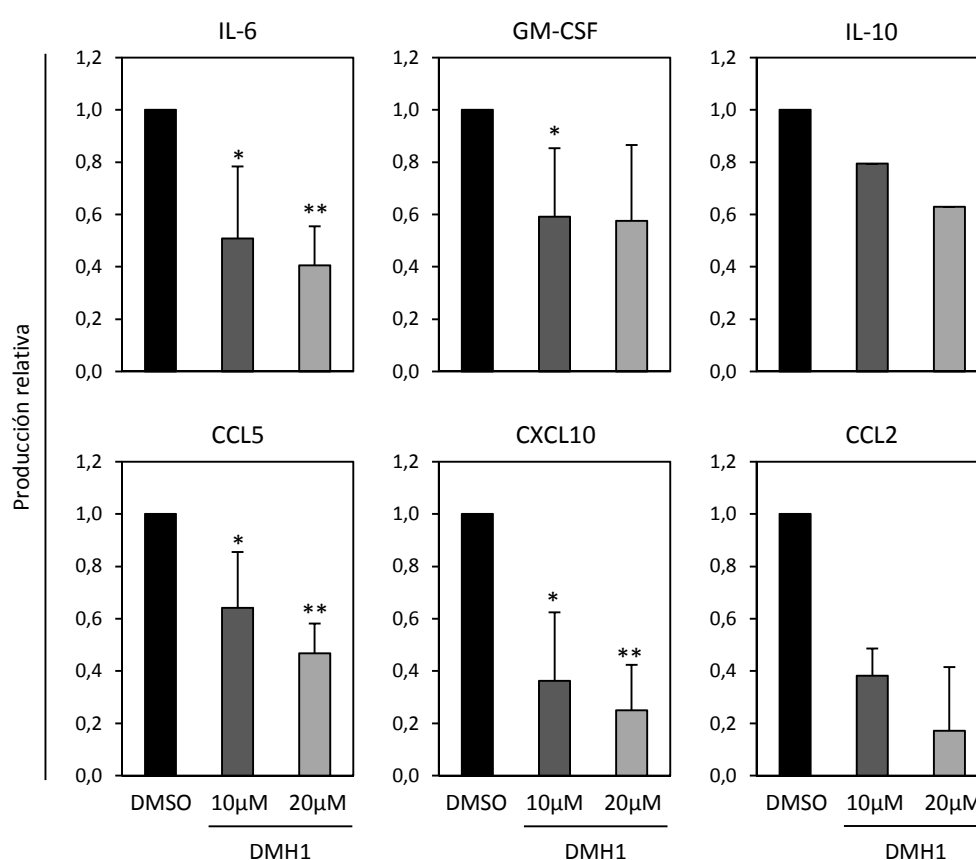


Figura 47. Efecto de DMH1 en la producción de citoquinas y quimioquinas. Células NK aisladas fueron activadas con IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5µg/ml), solas (DMSO) o tratadas con distintas dosis de DMH1. Tras 12 horas de cultivo, los sobrenadantes fueron recogidos y se analizó mediante CBA la cantidad de IL-6, GM-CSF, IL-10, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1. Los datos representan la media (\pm desviación estándar), de 2-4 experimentos, y se expresan como relativos a los controles individuales (DMSO). (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Comparación DMSO y las distintas dosis de DMH1)

En conjunto estos resultados indican una clara relevancia de la señalización autocrina de BMP en la capacidad de las células NK para producir distintos factores solubles importantes para su funcionalidad.

3.6.2 El bloqueo de la ruta de señalización BMP durante la activación de las células NK reduce drásticamente su actividad citolítica

Puesto que, además de la secreción de citoquinas y quimioquinas, las células NK tras activación modifican su fenotipo y adquieren una mayor capacidad citotóxica, a continuación analizamos si la señalización BMP también jugaba un papel relevante en este aspecto funcional de las células NK. Para ello, analizamos la expresión de diferentes antígenos de superficie comparando las células estimuladas en condiciones control con aquellas activadas en presencia de diferentes dosis de DMH1. La expresión de la mayoría de los receptores no se veía modificada por la presencia del inhibidor (datos no mostrados), sin embargo sí observábamos cambios en los niveles de expresión del marcador de activación CD69, así como en la expresión del receptor de citotoxicidad Nkp46 (Figura 48A). La expresión de ambos se veía reducida con el tratamiento con DMH1, aunque en esta ocasión no había diferencias entre las distintas dosis del inhibidor utilizadas.

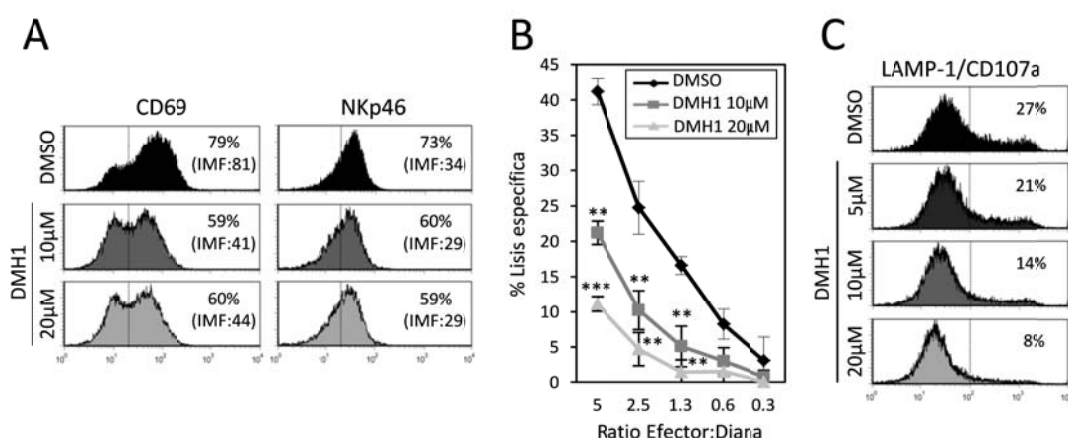


Figura 48. Efecto de DMH1 sobre el fenotipo y capacidad citotóxica de las células NK activadas. Células NK aisladas fueron estimuladas durante 12 horas con IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5μg/ml) en ausencia (DMSO) o presencia de las cantidades indicadas de DMH1. (A) Se analizó mediante citometría de flujo cambios en la expresión de CD69 y Nkp46. En cada histograma se muestra el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia y se corresponde con un experimento representativo de 4 experimentos independientes. (B) Células NK activadas fueron recogidas y cultivadas con la línea tumoral K562. Tras 4 horas de co-cultivo se determinó su capacidad citolítica mediante un ensayo de citotoxicidad basado en la medida de la actividad de la enzima LDH. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de lisis específica de distintos ratios célula efectora:célula diana, de tres muestras individuales. (C) Adicionalmente, se analizó por citometría de flujo la expresión del marcador de degranulación LAMP-1 en las células NK tras el co-cultivo con la línea K562. En los histogramas, correspondientes a un experimento representativo, se muestra el porcentaje de células positivas para LAMP-1. (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Comparación DMSO y las distintas dosis de DMH1)

En cuanto a la capacidad citotóxica, el bloqueo de la señalización BMP provocaba una drástica reducción del porcentaje específico de células K562 lisadas (Figura 48B). Esta disminución de la capacidad lítica era más patente cuanto mayor era la dosis del inhibidor,

como también lo eran los niveles de expresión del antígeno LAMP-1/CD107a, un marcador que revela la secreción del contenido de los gránulos líticos (Figura 48C).

Por otra parte, estudiamos si el bloqueo de la señalización BMP exclusivamente durante la fase lítica podría afectar a la función de las células NK. Para ello, tras la activación de estas células en condiciones normales, comparamos el porcentaje de citotoxicidad de las células NK a las que se les había añadido el inhibidor durante la propia fase lítica, frente a las que habían desarrollado su actividad en ausencia del mismo. Como se puede observar en la Figura 49, la inhibición de la vía señalización BMP únicamente durante esta fase no afectaba a la capacidad citolítica de estas células.

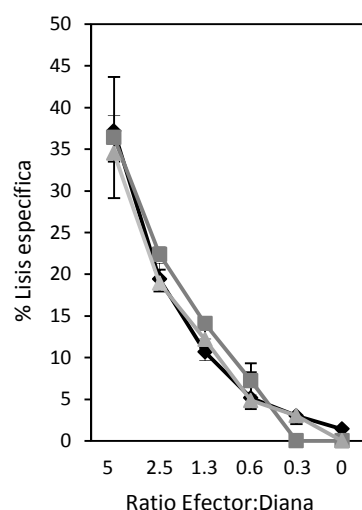


Figura 49. Efecto de DMH1 durante la fase lítica de los ensayos de citotoxicidad con células NK activadas. Células NK aisladas fueron activadas con IL-2 (50ng/ml) + IL-12 (10ng/ml) + PolyI:C (12,5µg/ml). Tras 12 horas las células fueron recogidas y cultivadas con la línea tumoral K562, en ausencia (DMSO) o presencia del inhibidor DMH1, durante 4 horas. Tras este periodo de tiempo se determinó la actividad citolítica utilizando un ensayo de citotoxicidad LDH. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar del porcentaje de lisis específica de distintos ratios célula efectora:célula diana, de 2 experimentos independientes.

3.6.3 El bloqueo de la vía de señalización BMP inhibe la maduración de MoDCs inducida por las células NK

Puesto que cada vez son más los trabajos que describen una influencia bidireccional entre las células NK y las DCs^{28,138,139}, y con el fin de ahondar en el papel de la señalización BMP en la funcionalidad de las células NK, el siguiente objetivo fue investigar cómo afectaba el bloqueo de la ruta en su capacidad de inducir la maduración de MoDCs. Para ello, monocitos de sangre periférica fueron cultivados en presencia de IL-4 y GM-CSF con objeto de inducir su maduración. Tras 6 días de cultivo las DCs inmaduras obtenidas fueron inducidas a madurar en presencia o ausencia de células NK no estimuladas, o previamente activadas en condiciones control o tratadas con DMH1. Después de 48 horas de cultivo, analizamos la capacidad de las células NK para inducir la maduración de las DCs en cada una de las condiciones experimentales. En primer lugar estudiamos la expresión de moléculas características de DCs

maduras, observando que las DCs que habían estado junto con células NK activadas presentaban los mayores niveles de expresión tanto de CD80 como de CD83. Sin embargo, la inhibición de la señalización BMP durante la activación de las células NK se traducía en un defecto de las mismas para inducir la expresión de estos marcadores en las DCs, puesto que estas MoDCs presentaban menores niveles de ambos, incluso por debajo del de las DCs cultivadas únicamente con el medio o cocultivadas con células NK no activadas (Figura 50A).

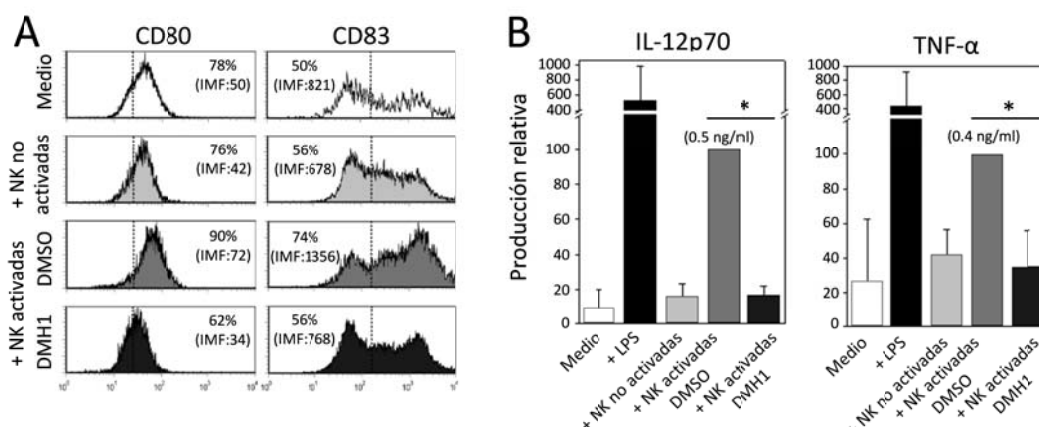


Figura 50. Efecto de DMH1 sobre la capacidad de células NK de inducir la maduración de DCs. DCs inmaduras fueron generadas a partir de monocitos de sangre periférica mediante el cultivo con GM-CSF e IL-4. Tras 6 días de diferenciación fueron cultivadas junto con células NK, previamente activadas (IL-2+IL-12+PolyI:C) tratadas o no (DMSO) con DMH1 durante 12 horas. (A) Después de 2 días de co-cultivo, la expresión de marcadores de maduración fue analizada en las distintas DCs maduras generadas. Cada histograma muestra el porcentaje de células positivas para CD80 y CD83, así como la intensidad media de fluorescencia. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. (B) De la misma forma, los sobrenadantes de los co-cultivos fueron recogidos y empleados para la medición por ELISA de las concentraciones de IL-12p70 y TNFα presentes en el medio. Las gráficas muestran la media \pm desviación estándar de las cantidades referidas a los cultivos control (células NK activadas DMSO)

Además, estudiamos la capacidad de estas DCs para producir IL-12p70 y TNFα, utilizando como control positivo DCs maduras con LPS. En ningún caso los niveles de secreción alcanzaron los producidos por la presencia de LPS. No obstante, de nuevo observábamos una reducción de alrededor del 60% en la producción de estas citoquinas por parte de las DCs maduras con células NK activadas en presencia de DMH1 respecto a las maduras con células NK activadas en condiciones control, alcanzando niveles similares a los producidos por las DCs maduras con células NK no activadas o incluso a los producidos por DCs cultivadas sin estímulo madurativo (Figura 50B).

Estos datos indican que la inhibición de la vía de señalización BMP durante la activación de las células NK conduce a un defecto en su capacidad para inducir la maduración de DCs.

En conjunto, los datos mostrados demuestran que la señalización BMP autocrina modula la funcionalidad de las células NK, tanto a nivel de producción de mediadores solubles como a nivel de actividad citotóxica y capacidad de regulación de las DCs.

DISCUSIÓN

El timo humano es colonizado por progenitores hematopoyéticos caracterizados por expresar altos niveles de CD34. Esta población CD34^{bright}CD1a⁻, incluida dentro de la población de timocitos DN, se corresponde con precursores multipotentes que en el timo generan fundamentalmente células T¹⁷⁶.

El presente trabajo pone de manifiesto la existencia de una subpoblación de precursores tímicos tempranos CD34⁺CD1a⁻ que expresan todos los componentes de la vía de señalización BMP2/4.

La expresión de BMP4 en timo fue descrita por primera vez en ratón por Outram y colaboradores en el año 2000²¹⁵, y desde entonces se han publicado otros trabajos en los que se ha ahondado en el papel del morfógeno en el mantenimiento de los precursores intratímicos y en la diferenciación hacia células T. De esta manera, en el modelo de ratón, BMP4 inhibe la proliferación de los timocitos DN, y bloquea su diferenciación hacia el estadio DP^{216,218}.

Efectos similares de BMP4 fueron descritos por nuestro grupo en timo humano²²¹. Asimismo, resultados de este trabajo muestran que la adición de BMP4 a los cultivos organotípicos tímicos reconstituidos con la población de precursores más tempranos CD34⁺CD1a⁻ de timo humano bloquea la diferenciación hacia el linaje T, provocando un aumento de dichos precursores respecto a los cultivos control, así como un fuerte incremento de la presencia de células NK, CD56⁺CD3⁻, lo que sugiere un posible papel de BMP4 en la diferenciación de este linaje.

Como ya ha sido señalado, los datos relativos a las células NK en el timo humano son muy escasos, y la mayoría de los estudios se han limitado al análisis del potencial de diferenciación de las distintas subpoblaciones de precursores definidas dentro de este órgano. Dentro de la población de precursores, las células CD34^{bright}CD33⁺ representan los ETPs que mantienen el potencial linfomieloide^{39,262}. Sin embargo, se han descrito también progenitores intratímicos bipotenciales T/NK y NK/DC^{81,164,165,171,176,248}. Si estos progenitores más comprometidos diferencian en el timo a partir de los ETPs o si la población de progenitores que coloniza la glándula es heterogénea, es hoy una cuestión abierta. Nuestros datos reflejan que alrededor del 20% de los precursores intratímicos tempranos CD34⁺CD1a⁻ expresan el receptor de BMP tipo IA. Además, la caracterización fenotípica de esta población muestra que estas células CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ presentan características típicas de precursores de células NK. La expresión mayoritaria de marcadores como CD161, CD122/IL-15R β y CD215/IL-15R α en los progenitores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ apoya fuertemente esta idea. En línea con nuestros

resultados, Poggio y col ²⁶³ describieron la expresión del antígeno CD161 en una pequeña fracción de progenitores intratímicos CD34⁺CD117⁺. Estas células eran capaces de generar células citolíticas tras su cultivo con IL-2, lo que apuntaría su naturaleza de progenitores de células NK. Dadas sus características fenotípicas, esta población descrita por otros autores podría estar incluida en la subpoblación CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ descrita en el presente trabajo.

Igualmente, la expresión de CD215 y CD122 es también mayor en la población de precursores CD34⁺CD1a⁻ que expresan BMPRIA que en la que no lo expresa, lo cual sugiere la relevancia de IL-15 en la diferenciación de estos precursores BMPRIA⁺. Como ya ha sido comentado en anteriores ocasiones a lo largo del trabajo, la importancia de IL-15 en la biología de las células NK ha sido ampliamente descrita ^{38,54,79,264-266}. IL-15 promueve selectivamente la generación de este linaje y la capacidad de responder a la citoquina marca un paso importante en el compromiso de los precursores y en la diferenciación de las células NK ^{38,79,266}.

La expresión mayoritaria de otros marcadores como CD117 y CD127/IL-7Rα en la población CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ también pone de manifiesto la relación de estos precursores con el linaje NK. CD117 ha sido utilizado, junto con CD94, para definir estadios discretos de diferenciación de células NK en ganglio linfático humano, siendo su expresión una característica típica de los precursores de este linaje ⁴³. Asimismo, ninguna de las subpoblaciones de precursores del presente estudio expresan CD94, como cabría esperar por ser un marcador de estadios más avanzados de la diferenciación de células NK. En cuanto a CD127, si bien IL-7 ha sido descrita como un citoquina fundamental en la generación de células T en el timo ^{172,262}, también es crucial para la diferenciación en ratón de las células NK de timo ⁸⁸.

La expresión de CD116 y CD135, receptores para GM-CSF y FLT3L respectivamente, ha sido relacionada con precursores con capacidad para generar células NK y DCs ^{164,267}. De la misma forma, las células CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ exhiben una mayor expresión de ambos marcadores que las células CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻.

Las diferencias en cuanto a la expresión de otros marcadores como CD7, CD44, CD45RA o CD38 en ambas subpoblaciones no son remarcables, y sólo ratifican las características de células precursoras de ambas subpoblaciones ^{39,172}.

Cabe destacar la diferencia en los niveles de expresión de CD5 entre las subpoblaciones de progenitores CD34⁺CD1a⁻ definidas en función de la expresión de BMPRIA, siendo muy inferior en aquellos precursores que expresan el receptor para BMP. La pérdida de expresión de CD5

marca un paso importante en el compromiso de los precursores intratímicos hacia linajes no T²⁴⁸. Así, las células precursoras que ya no expresan altos niveles de CD34 pueden ser divididas en dos subpoblaciones con distinto potencial de diferenciación. Por un lado, células CD34^{lo}CD44^{lo}CD5⁺ que aunque son capaces de generar células NK, generan fundamentalmente células T, y por otro, células CD34^{lo}CD44^{hi}CD5^{lo/-} que son capaces de generar DCs pero también, y con mucha mayor eficacia que la población anterior, células NK²⁴⁸. En este sentido, nuestros resultados muestran no sólo que los precursores BMPRIA⁺ exhiben una menor expresión de CD5, sino que la expresión de BMPRIA en la subpoblación CD34^{lo}CD44^{hi}CD5^{lo/-} es significativamente mayor que en la población CD34^{lo}CD44^{lo}CD5⁺.

Además de la expresión de determinados marcadores de membrana, el compromiso de los progenitores hacia los distintos linajes hematopoyéticos es regulado por un número reducido de factores de transcripción^{268,269}. Estos factores están bien definidos en los linfocitos T, en los linfocitos B y en otras células hematopoyéticas. En el caso de las células NK, si bien la identificación de un factor “master” que determine el compromiso hacia el linaje NK todavía no ha sido bien definido, se conocen distintos factores de transcripción que participan en el proceso de diferenciación y maduración de estas células^{268,269}. La expresión de estos factores de transcripción ha sido analizada en el presente trabajo, llevando a cabo un estudio comparativo del perfil transcripcional de los precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ frente a los BMPRIA⁻. Estos resultados de nuevo sugieren la relación entre los precursores que expresan el receptor de BMP tipo IA y el linaje NK.

En el año 2009 investigaciones de dos laboratorios independientes identificaban NFIL3 como un factor master y específico para la diferenciación y maduración de las células NK. Ratones deficientes para este factor de transcripción presentaban una alteración en la generación de células NK, que se traducía en una fuerte reducción en el número de células NK en periferia sin afectar a otras poblaciones linfoides. Además, estas células NK exhibían defectos en la maduración y en sus capacidades funcionales^{76,77}. Sin embargo, posteriormente se han publicado otros trabajos en los que se rebate la especificidad de este factor, puesto que no sólo parece ser necesario para la diferenciación de otros tipos celulares como las DCs convencionales CD8α⁺ de ratón²⁷⁰, sino que además las diferentes vías de diferenciación descritas para las células NK de ratón también parecen tener requerimientos diferenciales de NFIL3^{84,89}. En el caso del timo, Wolterink y col¹⁷⁶ proponen en ratón un modelo de diferenciación T vs NK en el cual el balance de los niveles de NFIL3 y BCL11B, factor clave en la diferenciación temprana de linfocitos T²⁷¹, condiciona el destino de los progenitores hacia un linaje u otro respectivamente. En nuestro estudio, mientras que los niveles de expresión de

NFIL3 en los progenitores tímicos CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ son hasta 10 veces superiores que en los precursores BMPRIA⁻, los niveles de expresión de BCL11B son significativamente inferiores en la subpoblación que expresa BMPRIA, sugiriendo que el balance de expresión entre estos factores en los precursores intratímicos humanos BMPRIA⁺, tal y como proponen Wolterink y col¹⁷⁶ en el modelo de ratón, condicionaría su diferenciación hacia células NK.

Además de NFIL3, numerosos trabajos describen la importancia de las proteínas Id, principalmente Id2 e Id3, en la diferenciación de las células NK^{79-81,272,273}. En humano, la expresión forzada de Id2 e Id3 en progenitores tímicos inhibe su diferenciación hacia células T y promueve la generación de células NK^{80,81}. No obstante, la relevancia de Id2 en el compromiso de los progenitores linfohematopoyéticos hacia el linaje NK no está del todo clara, puesto que ratones deficientes para ID2 muestran un número normal de precursores de células NK así como células NK inmaduras en médula ósea, si bien tienen una severa deficiencia de células NK maduras en periferia⁷⁹.

Nuestros resultados indican que los precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ expresan niveles altos de ID3. En el caso de ID2, los niveles de expresión, inicialmente bajos, aumentan durante la diferenciación *in vitro* de las células NK a partir de precursores BMPRIA⁻, alcanzando niveles de expresión muy elevados en las células NK diferenciadas. De acuerdo con lo descrito previamente en ratón⁷⁹, nuestros resultados sugieren la cooperación de ambas proteínas Id en la diferenciación de las células NK, donde actuarían de manera secuencial. De este modo, Id3 participaría en el compromiso de estos precursores hacia el linaje NK mientras que Id2 participaría en estadios posteriores de diferenciación.

Por otra parte, cabe destacar que los niveles de expresión de GATA2 son muy superiores en los precursores BMPRIA⁺. Aunque los datos en la literatura son escasos, recientemente se ha descrito la importancia de este factor en la diferenciación de células NK en humano, puesto que mutaciones en GATA2 causan una severa deficiencia de células NK que afecta fundamentalmente a la población CD56^{bright}²⁷⁴.

Sin embargo, de forma similar a lo observado en el caso de ID2, los niveles de expresión de GATA3 en los precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ son muy similares a los exhibidos por los precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻. No obstante, la expresión del factor de transcripción también aumenta durante la diferenciación *in vitro* de las células NK intratímicas. Estos resultados sugieren una escasa importancia del factor en etapas tempranas de la diferenciación de las células NK en el timo humano, y estarían en consonancia con los descritos en el modelo de ratón, en el cual GATA3 es requerido para la generación de células NK tímicas

pero se asocia mayoritariamente con la maduración y la adquisición de las capacidades funcionales^{87,88}

Estos progenitores intratímicos CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ generan, a diferencia de lo observado en cultivos orgánicos quiméricos reconstituidos con precursores BMPRIA⁻, fundamentalmente células NK CD3⁻CD161⁺CD56⁺, en detrimento de la generación de timocitos, incluso bajo un ambiente favorable a la diferenciación de linfocitos T. Las células NK generadas en cultivos reconstituidos con precursores BMPRIA⁺ o BMPRIA⁻ expresan mayoritariamente los marcadores CD94 y NKp46, sugiriendo que ambas subpoblaciones de progenitores son capaces de dar lugar en un microambiente tímico a células NK maduras, si bien en proporciones drásticamente diferentes. En este sentido, las diferencias en cuanto a la mayor capacidad citotóxica y la mayor secreción de IFN γ exhibidas por las células presentes en los cultivos reconstituidos con precursores que expresan BMPRIA frente a los que no lo expresan, reflejaría precisamente el mayor número de células NK generadas a partir de los precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺, en consonancia con las imágenes obtenidas a microscopía electrónica y los datos de citometría.

Asimismo, el modelo *in vitro* de generación de células NK a partir de precursores CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ utilizado en este trabajo nos permitió estudiar la regulación de la expresión de BMPRIA durante la diferenciación de las células NK. La expresión del receptor se relaciona con la aparición temprana de un precursor CD34⁺CD161⁺, población que podría corresponderse con la descrita por Poggy y col²⁶³. Esta correlación entre la expresión de CD161 y BMPRIA se mantiene a lo largo del cultivo, no sólo en los primeros momentos, asociada a estos precursores CD34⁺CD161⁺, sino también en estadios posteriores correspondientes a células NK inmaduras CD34⁻CD5⁻CD161⁺CD56⁺. La frecuencia de esta población aumenta en los días posteriores de cultivo, y a medida que las células expresan mayores niveles de CD56, adquieren la expresión de marcadores típicos de estadios de diferenciación más avanzados de células NK como CD94 o NKp46^{43,52,248,275}. En el estadio de células NK maduras, la expresión de BMPRIA se regula negativamente como indican también los resultados obtenidos en el estudio *ex vivo* y que se comentarán posteriormente.

Durante la diferenciación *in vitro* de células NK a partir de precursores intratímicos, no sólo incrementa el porcentaje de células BMPRIA⁺ sino que también aumenta la producción de su ligando BMP4 a lo largo del cultivo, señalando un posible papel autocrino de la vía de señalización durante la diferenciación. La relevancia de esta vía se pone de manifiesto cuando bloqueamos la ruta de señalización BMP, observando que esta vía participa en diferentes

puntos de la diferenciación de las células NK intratímicas, tanto antes como después de la adquisición de la capacidad para responder a IL-15, citoquina crítica en la diferenciación de las células NK^{38,266} 54,79,264,265

En estadios tempranos, la vía de señalización BMP parece promover la diferenciación de las células NK, puesto que el bloqueo de la misma con el inhibidor dorsomorfin reduce los niveles de expresión de CD122 así como de factores de transcripción relacionados con las células NK, principalmente NFIL3, ID2, ID3 y RUNX3. Al contrario, la estimulación de la señalización BMP, incluso en ausencia de IL-15, provoca un aumento en los precursores intratímicos de los niveles de expresión de CD122, así como ID3, ID2 y RUNX3, permitiendo su diferenciación hacia células NK inmaduras incapaces de expandirse presumiblemente debido a la ausencia de IL-15. Así, en los primeros estadios de la diferenciación NK, la vía de señalización BMP podría estar involucrada en la generación de una subpoblación de células capaces de responder a IL-15, probablemente mediante la regulación positiva de los niveles de expresión de ID2, ID3 y RUNX3. Las proteínas Id y los factores de transcripción RUNX son importantes genes diana de la señalización BMP en diferentes tipos celulares^{193,239,276}, incluidos los precursores CD34⁺ de timo humano, como así sugieren nuestros resultados. A su vez, se ha descrito la implicación de las proteínas Id2 e Id3 en el incremento de una subpoblación de progenitores tímicos humanos CD1a⁻CD5⁺ dada su capacidad para reprimir la función de proteínas E, principalmente HEB, que conlleva la inhibición del desarrollo de células T^{80,81}. Asimismo, se ha descrito la expresión de RUNX3 a lo largo de la diferenciación de las células NK, desde células precursoras hasta células NK maduras, así como la capacidad de RUNX3 de unirse a la región promotora de CD122 y de esta forma, regular positivamente la expresión de la cadena β del IL-15R en estadios tempranos de diferenciación de las células NK²⁷⁷. Por último, nuestros resultados muestran que la expresión de NFIL3 también es regulada por la señalización BMP, y en relación, otros autores han indicado que la acción de NFIL3 está mediada por ID2⁷⁶.

No obstante queda por determinar qué factor o factores contribuyen a generar un pool de precursores capaces de responder a BMP puesto que nuestros resultados muestran que a partir de precursores BMPRIA⁻ se generan células BMPRIA⁺. Entre estos factores podría estar implicado SCF, producido por células del estroma tímico²⁷⁸ y cuyo receptor, CD117, es expresado por los progenitores que no expresan BMPRIA. Además, nuestros resultados sugieren que el cultivo de esta subpoblación a corto plazo en presencia únicamente de esta citoquina modula, no sólo la expresión de los componentes del receptor para IL-15, sino que promueve también la aparición de células BMPRIA⁺ (datos preliminares, no mostrados).

Por otra parte, diferentes trabajos han señalado que IL-15 juega un papel esencial promoviendo la supervivencia, proliferación y diferenciación de precursores comprometidos con el linaje NK ^{79,81,176,264}. En este contexto, nuestros resultados muestran que tanto la expresión de BMPRIA como la producción del ligando BMP4 es inducida por IL-15, indicando que IL-15 promueve la señalización autocrina de BMP4 durante la diferenciación de las células NK. Además la inhibición de la vía de señalización de BMP disminuye la proliferación y la supervivencia inducida por IL-15 en las células NK que se están diferenciando, apuntando que la vía de señalización BMP media, al menos en parte, los efectos de IL-15. Asimismo, las proteínas Id, dianas de la señalización BMP, también parecen estar involucradas en este punto, puesto que Schotte y col ⁸¹, han descrito la implicación de Id2 en el control de la expansión de los precursores intratímicos capaces de responder a IL-15.

En cuanto al papel de BMP en otros puntos de la diferenciación, los datos presentados en este trabajo, muestran que la vía de señalización BMP también participa en estadios más avanzados del desarrollo de las células NK. Así, el bloqueo de la vía de señalización mediante el tratamiento con el inhibidor dorsomorfina genera un número muy disminuido de células NK maduras con una reducida capacidad citotóxica y una capacidad disminuida de secreción de citoquinas. De acuerdo con estos resultados, y con el hecho de que la vía de señalización BMP está mediando al menos en parte los efectos de IL-15, el análisis de ratones deficientes para IL-15, así como ratones deficientes para CD122 que sobreexpresan del factor de supervivencia Bcl-2, indican que en los últimos estadios de diferenciación, IL-15 participa induciendo la supervivencia de células NK maduras y la adquisición de sus funciones efectoras ^{279,280}.

Por otra parte, nuestros resultados *ex vivo* indican que en el timo humano se puede describir una secuencia de diferenciación del linaje NK equivalente a la previamente reportada por Freud y col. en ganglio linfático ⁴³. Estos autores establecieron cuatro estadios discretos de diferenciación, (i) estadio 1 o pro-NK, células CD34⁺CD117⁻CD94⁻, (ii) estadio 2 o pre-NK, células CD34⁺CD117⁺CD94⁻, (iii) estadio 3 o NK inmaduras, células CD34⁻CD117⁺CD94⁻ y (iv) estadio 4, células CD34⁻CD117^{+/+}CD94⁺. La expresión de CD56 era baja, o incluso nula en las células del estadio 3, pero se incrementaba hasta alcanzar altos niveles y presentar un fenotipo CD56^{bright} en el estadio 4. Según nuestro modelo de diferenciación, los precursores CD34⁺CD117⁻BMPRIA⁺ podrían ser equivalentes al estadio 2 o células pre-NK, CD34⁺CD117⁺CD94⁻, ya que comparten numerosas características fenotípicas como la expresión de CD117, CD45RA, o CD161, e incluso según nuestros resultados la de BMPRIA, así como la capacidad de responder a IL-15. Estos precursores intratímicos generan fundamentalmente células NK aunque son capaces de generar células DP en cultivos FTOC, de

la misma manera que ocurre con células del estadio 2 o pre-NK de órganos linfoides secundarios. Los precursores intratímicos CD34⁺BMPRIA⁺ avanzan hacia un estadio de células NK inmaduras BMPRIA⁺ caracterizado por la pérdida de expresión de CD34 y la adquisición progresiva de CD56. Estas células además expresan CD117 pero no CD94, siendo equivalente al estadio 3 de diferenciación descrito por Freud y col⁴³. En este punto, es interesante resaltar que a pesar de expresar todavía una baja intensidad de CD56, según el fenotipo exhibido (NCRs⁻KIR⁻CD16⁻CD57⁻) estas células no se corresponden con células NK CD56^{dim} recirculantes⁵⁸⁻⁶¹. Finalmente, siguiendo con la secuencia de diferenciación, la pérdida de expresión de BMPRIA así como la mayor expresión de CD56 y la adquisición de diferentes receptores activadores e inhibidores completan la diferenciación de estas células NK maduras intratímicas, que dado sus características fenotípicas podemos equiparlas al estadio 4 de diferenciación de células NK en ganglio linfático.

Por tanto, estos resultados describen por primera vez una secuencia de diferenciación de las células NK el timo humano. Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la expresión de BMPRIA identifica una población de precursores intratímicos que generan fundamentalmente células NK. Asimismo, la transición entre NK inmaduras y maduras ocurriría a través de dos posibles estadios intermedios, uno que regula positivamente CD56 sin regular negativamente BMPRIA, y otro que regula negativamente BMPRIA antes de incrementar la expresión de CD56.

Una cuestión clave es si las células NK generadas en el timo se mantienen en el órgano como una población residente o migran participando en el pool de células NK periféricas. Aunque los datos referentes a la salida de las células NK de los distintos órganos son muy escasos, se ha descrito la implicación de CXCR4 y de S1P5 en el control de la salida de las células NK de la médula ósea de ratón^{252 281}. De esta forma, mientras que CXCR4 retiene a las células NK en la médula ósea, S1P5 promueve su salida de este órgano²⁵² y regula la recirculación de estas células²⁵³. La expresión de estos marcadores en las células NK intratímicas sugiere que estas células no abandonan el timo una vez diferenciadas, ya que la expresión de S1P5 es notablemente menor que en las células NK de sangre periférica, especialmente respecto a las células CD56^{dim}. En cuanto a la expresión de CXCR4, las células NK intratímicas expresan bajos niveles de este receptor implicado en la retención de células NK en médula ósea de ratón. Sin embargo, la baja expresión puede deberse a que en el timo CXCR4 parece funcionar de manera contraria, puesto que se ha descrito que CXCL12, ligando de CXCR4, puede actuar como un quimiorrepulsor, participando en la emigración de los timocitos SP CD4⁺ en el timo fetal de ratón²⁸². A falta de marcadores propios de las células NK

analizamos también la expresión de otros marcadores que han sido implicados en la salida de la glándula tímica de linfocitos que han completado el proceso de diferenciación. En este sentido, los cambios en la expresión de estos receptores a medida que las células NK diferencian, así como el fenotipo de las células NK intratímicas maduras, CD69⁺CD44⁺CD62L^{+/-}CCR7⁻CD31⁻, que difiere notablemente de los RTEs ^{250-252,283-286} sugieren que, atendiendo a estos marcadores, las células NK no abandonan la glándula tímica donde diferencian.

En relación con la salida de las células NK, Vosshenrich y col ⁸⁸ también propusieron que las células CD56^{bright} de sangre periférica en humano derivarían de las células NK diferenciadas en el timo, puesto que esta población presenta características fenotípicas y funcionales similares a las que ellos describen para las células NK de timo de ratón como es la expresión de CD127 y del factor de transcripción GATA-3 ⁸⁸. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, así como con los de otros autores ^{81,178}, la expresión de CD127 en las células NK de timo humano no es mayoritaria en esta población. Asimismo, trabajos posteriores en ratón han descrito que la expresión de CD127 no es exclusiva de las células NK intratímicas ¹⁷⁷. Por otro lado, si bien en humano las células NK intratímicas expresan GATA3, los niveles son muy inferiores a los presentados por las células CD56^{bright}, incluso significativamente inferiores a los de las células CD56^{dim}. Por tanto, nuestros resultados indican por un lado que las células NK diferenciadas en el timo humano mayoritariamente se mantendrían como una población residente, y por otro rebaten la hipótesis de Vosshenrich y col ya que la población de células NK CD56^{bright} de sangre periférica no parece tener un origen tímico en el caso humano.

El hecho de que las células NK maduras permanezcan en el timo sugiere una posible función dentro del órgano como ha sido descrito para otros tejidos donde existe una población de células NK residentes ^{38,43,48,107,109-113}. En esta línea, nuestros resultados indican que las células NK intratímicas exhiben características fenotípicas particulares. De esta forma, mientras que la expresión de CD94, NKp46 o NKp44 es similar a la exhibida por la población de células CD56^{bright} de sangre periférica, los niveles de expresión del antígeno CD16 y de los KIR inhibidores presentan un patrón más similar a las células CD56^{dim} periféricas. En cuanto al patrón de expresión de receptores de citoquinas, nuestros resultados indican que como se ha descrito previamente para las células NK de otras localizaciones, las células NK intratímicas maduras expresan receptores para IL-15, IL-18 e IL-7. Como ocurre en periferia, las DCs tímicas podrían ser fuente de estas citoquinas junto al epitelio medular cuya capacidad para producir dichos factores ha sido previamente demostrada ²⁸⁷⁻²⁸⁹. Con respecto a los receptores de quimioquinas, un patrón diferencial es exhibido por las células NK intratímicas respecto a aquellas halladas en periferia. Mientras que la subpoblación periférica de células NK CD56^{bright}

expresa mayoritariamente CXCR4 y CCR7 y las células NK CD56^{low}, CXCR1, CX3CR1 y CXCR4 (tal y como muestran nuestros resultados, así como los datos presentes en la literatura ^{14,290}), las células NK aisladas de timo expresan mayoritariamente CCR2 y CCR5. Estos receptores pueden responder a múltiples quimioquinas, clásicamente relacionadas con la migración de las células NK bajo condiciones de inflamación ²⁹¹.

Por otra parte, las células NK presentes en otros órganos como hígado o decidua presentan diferentes características en cuanto a la capacidad citotóxica, tanto en condiciones basales como tras activación, existiendo diferentes factores capaces de modular esta actividad ^{38,43,48,107,109-113}. Así en el hígado, si bien existen evidencias que muestran que las células NK hepáticas son capaces de lisar células diana de manera incluso más eficiente que las células NK CD56^{dim} de sangre periférica ^{292,293}, en condiciones basales la actividad citolítica de las células NK en este órgano está inhibida a través de factores producidos por otras células hepáticas, como son las células de Kupffer que secretan TGFβ e IL-10, induciendo la activación del receptor inhibitor NKG2A en esta población de células NK ^{113,254}. En el caso de las células NK de la decidua, éstas exhiben una capacidad citotóxica reducida respecto a las células NK de sangre periférica ²⁵⁶. Esta baja actividad se asocia con varios factores como (i) la incapacidad de estas células NK de formar una sinapsis inmunológica apropiada ²⁹⁴, (ii) la expresión de receptores inhibidores para HLA-C, HLA-E y/o HLA-G expresados por células del trofoblasto ^{113,255,256} o (iii) la expresión de L-Galectina ²⁵⁷). Sin embargo, esta población contiene grandes cantidades de granzima y perforina, lo cual sugiere que las células NK de la decidua son potencialmente citotóxicas ¹¹¹ y que bajo determinadas circunstancias ²⁹⁵, como una infección, podrían desempeñar dicha actividad. En este sentido, la estimulación de estas células con IL-2 o IL-15 aumenta significativamente la capacidad citotóxica de las mismas ²⁹⁴⁻²⁹⁶. Asimismo, las células NK de sangre periférica son capaces de exhibir características similares a las células NK de la decidua, modificando su fenotipo y reduciendo su citotoxicidad bajo condiciones de hipoxia y en presencia de TGFβ ²⁹⁶. Estos datos sugieren que las células NK presentan una gran plasticidad en función del microambiente en el que se encuentren. Como en el caso del hígado y del útero, nuestros resultados apuntan a que las células NK presentes en timo humano presentan una baja capacidad citotóxica de la que sería responsable un conjunto de factores que, como en los sistemas comentados anteriormente, incluiría la reducida expresión de granzima y perforina, la expresión mantenida tanto de TGFβ como de Smad3 tras activación, la expresión del receptor inhibitor NKG2A y el incremento de la expresión de L-Galectina que observamos en células NK estimuladas.

A tenor de lo anterior y como ha sido apuntado para otros órganos como hígado o útero, el papel de las NK intratímicas se relacionaría entonces más con una función inmunomoduladora que con una función citotóxica. Como ha sido descrito en periferia^{28,297-299}, la producción de IFN γ por las células NK podría contribuir a la activación de las DCs tímicas que a su vez y a través de la secreción de IL-12, IL-15 o IL-18, podrían activar a las células NK estimulando la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias por parte de estas últimas. Asimismo, las células NK intratímicas producen niveles significativamente mayores que las células NK de periferia de otras quimioquinas proinflamatorias como CXCL10 e incrementan significativamente la expresión de XCL1 tras activación. En relación con esto, nuestro grupo recientemente ha descrito una población de DCs BDCA3^{high} en el timo humano que expresan altos niveles de XCR1, receptor de XCL1 (Canseco, N.M manuscrito en revisión), cuya expresión ha sido descrita esencial para la localización de las DCs en la médula tímica³⁰⁰. Además, nuestros resultados preliminares indican que las células NK co-localizan con DCs plasmacitoides intratímicas, y que éstas expresan altos niveles de CXCR3, receptor de CXCL10, quimioquina producida en grandes cantidades por las células NK intratímicas estimuladas. Finalmente, resultados de nuestro grupo también indican que diferentes poblaciones de DCs intratímicas expresan altos niveles de CCR2, receptor capaz de responder a CCL2, quimioquina que ha sido relacionada con la inducción de tolerancia en el timo³⁰¹ y que según los datos presentados en el presente trabajo es secretada por las células NK intratímicas tras su activación. Los resultados anteriores sugieren por tanto, que como en periferia^{13,28,138}, también en el timo las células NK y las DCs establecerían un *cross-talk* cuya relevancia está por establecer. Recientemente se ha demostrado la implicación de DCs, tanto convencionales³⁰² como plasmacitoides³⁰³, en la diferenciación de células T reguladoras en el timo humano. Si las células NK intratímicas participan de alguna forma en la regulación de este proceso, de manera similar a lo que ocurre tanto en útero como en hígado^{112,113} es algo que actualmente estamos evaluando.

Por otra parte, la activación de las células NK no es únicamente dependiente de las citoquinas liberadas por otras células innatas, pudiendo ser también conseguida a través de la estimulación TLRs capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Las células NK expresan TLRs independientemente de su estado de activación y pueden actuar de forma sinérgica con señales mediadas por quimioquinas y citoquinas para activar las capacidades funcionales de las células NK²⁵⁸.

Los niveles de expresión de TLRs en las células NK intratímicas son en general superiores a los expresados por las células NK de sangre periférica, destacando la alta expresión de TLR1 y

TLR3. Respecto a su capacidad para responder a estos estímulos, la activación con agonistas de estos receptores de una población enriquecida en células NK que contiene DCs o células accesorias promueve la secreción de IFN γ por parte de las células NK. Sin embargo, la estimulación directa de estas células NK intratímicas vía TLR1 o TLR3 no conlleva la producción de esta citoquina. Tampoco promueve la actividad lítica de estas células, puesto que presentan una nula capacidad citotóxica, incluso por debajo de la exhibida por estas células cuando son estimuladas por citoquinas. Estos resultados estarían en línea con lo descrito para las células NK de la decidua, ya que esta población tampoco responde directamente a la estimulación vía TLR, sino que requiere de la interacción con células accesorias, como DCs, para la producción de IFN γ ³⁰⁴. Este hecho explicaría las diferencias observadas en nuestro caso, entre la estimulación de la población que contiene distintos tipos celulares y las células NK intratímicas purificadas, ya que en el primer caso, la presencia de otros tipos celulares podría colaborar en la activación de las células NK. En este sentido, aunque algunos patógenos, como influenza o CMV, pueden ser reconocidos directamente por las células NK, la mayoría de los patógenos son reconocidos de forma indirecta y se requiere de señales derivadas de otras poblaciones celulares. De esta forma, en muchas ocasiones, las células NK aisladas de sangre periférica fallan en la respuesta frente a patógenos mientras que no lo hacen si son estimuladas en presencia de otros tipos de células ³⁰⁵.

Aunque tradicionalmente el timo ha sido considerado un órgano inmune privilegiado, lo cierto es que su función está afectada durante la infección por múltiples patógenos, incluidas algunas bacterias ^{306,307}. La infección tímica por *Mycobacterium* ha sido descrita tanto en humano ³⁰⁸ como en modelos animales, donde la infección experimental con *M. avium* y *M. tuberculosis* conduce al establecimiento de la infección en el timo de los ratones infectados ^{309,310}.

Como ya hemos comentado, las células NK son capaces de actuar frente a diversos organismos, incluyendo *Mycobacterium* ^{133,311-313}. En esta línea, datos preliminares del laboratorio de la Dra. Margarida Correia-Neves en colaboración con nuestro grupo, indican un aumento en el porcentaje de células NK en los timos de ratones infectados tanto con *M. avium* como con *M. tuberculosis*. Este porcentaje aumenta ligeramente desde las primeras semanas después de la infección, llegando a ser significativos cuando la carga bacteriana ha alcanzado su punto máximo en el timo.

En ambos casos la infección del timo conlleva una respuesta inmune caracterizada por la aparición de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para antígenos de *Mycobacterium* ³¹⁴. Estas

células T no se originan del pool de células que están diferenciando sino que son células T que recirculan desde órganos periféricos hacia el timo para controlar la infección. El reclutamiento de estas células es dependiente de la expresión de CXCR3 en las mismas, y de la producción de sus ligandos CXCL9 y CXCL10 en el timo infectado ³¹⁴. Cabe destacar que nuestros resultados muestran un incremento acusado de la producción de CXCL10 cuando las células NK de timo humano son activadas. Además, la expresión de IFN γ así como de CCL5 y XCL1, para las cuales se ha descrito una secreción en bloque por parte de las células NK en respuesta a un proceso infeccioso ³¹⁵, aumenta en las células NK intratímicas tras activación.

Existen cada vez más evidencias, tanto *in vitro* como *in vivo*, del papel de las células NK en el control de la infección por *Mycobacterium*, especialmente *M. tuberculosis* ³¹³. Entre los diferentes mecanismos de reconocimiento por parte de las células NK de las células infectadas que han sido descritos, se incluye tanto la expresión de ligandos de receptores activadores como NKG2D, NKp46 o NKp44, como el reconocimiento vía TLR, principalmente TLR2. Asimismo, TLR2 actúa, en ocasiones, junto con TLR1 ³¹⁶, cuyos niveles de expresión, según muestran nuestros resultados, son superiores a otros TLRs en las células NK intratímicas. Además, se ha descrito que esta respuesta se regula fuertemente en presencia de citoquinas proinflamatorias como IL-12, que pueden ser producidas por otras células como células T o DCs, en respuesta a *Mycobacterium* ³¹³.

De esta forma, aunque son sólo resultados preliminares, estos datos podrían sugerir que bajo condiciones de infección, las células NK intratímicas podrían reconocer de manera directa o indirecta la presencia en el órgano de patógenos como *Mycobacterium* y participar en la eliminación de los mismos, bien mediante la producción de citoquinas como IFN γ o TNF α , bien mediante la producción de otros factores como CXCL10, responsables del reclutamiento de células T periféricas y del inicio de la fase adaptativa de la respuesta inmune en el órgano.

La última parte de los resultados del presente trabajo se centra en el estudio del papel de la vía de señalización BMP en la funcionalidad de las células NK de sangre periférica. Como hemos comentado anteriormente, los escasos datos presentes en la literatura en relación con el papel de los componentes de la superfamilia TGF β en la biología de las células NK se han centrado en el estudio de dos de sus miembros fundamentales como son Activina A o TGF β 1 ^{155,241,242,244,245,317}. Ambas proteínas ejercen un efecto inhibitorio en la funcionalidad de las células NK. Así, TGF β inhibe la capacidad citolítica y la capacidad de producción de citoquinas de las células NK, así como la expresión de NKp30 o NKG2D ^{155,242,317} y resultados similares se han observado con Activina-A, aunque a diferencia de TGF β , parece que en este caso no

influye en la actividad lítica de las células NK ²⁴¹. Por el contrario y como ha sido descrito en otros sistemas ^{226,236,238,239} nuestros datos indican que la activación de la vía de señalización BMP tendría un papel positivo en la funcionalidad de las células NK y por lo tanto contrario a lo descrito para otros miembros de esta familia.

Las células NK en estado basal, expresan los receptores necesarios para responder a ligandos BMP. Asimismo, la expresión de estos receptores y de otros componentes de la vía como las proteínas Smad1 (BR-Smad) o Smad4 (Co-Smad) necesarias para la transducción de la señal ^{179,180,317} aumenta de manera significativa en las células NK activadas. Igualmente también se observa un incremento en la fosforilación de las BR-Smad. A su vez, componentes que regulan negativamente la señalización BMP ^{179,180,317} se ven disminuidos y, de acuerdo a lo previamente descrito por otros autores ³¹⁷, la expresión de TGFβ y de Smad3, R-Smad necesaria para dicha señalización, disminuye también tras activación de las células NK.

La activación de la vía canónica de señalización BMP así como la expresión de ligandos BMP tras la activación de las células NK, sugieren un papel autocrino de dicha vía en este proceso. El bloqueo de la vía de señalización BMP no afecta a la viabilidad de las células NK activadas, pero reduce significativamente su capacidad proliferativa. Como ya hemos comentado anteriormente, la participación de la vía de señalización BMP en este proceso no es un hecho aislado, sino que BMP juega un papel importante en la regulación de la proliferación de diversos tipos de células del sistema inmune ^{222-224,228,230}.

Asimismo, nuestros resultados muestran que la señalización BMP también es necesaria para la secreción de factores solubles, puesto que el bloqueo de la vía conlleva una acusada disminución en la capacidad de producción de distintas citoquinas y quimioquinas. Entre ellas cabe destacar la reducción observada en la secreción de IFNγ, citoquina que representa un mecanismo importante en la primera línea de defensa. Efectos positivos de la señalización BMP sobre la producción de IFNγ también se han visto en células CD8⁺ de ratón, donde el tratamiento con BMP4 incrementa significativamente la producción de la citoquina (Takai S Int J Mol Med. 2010). Aunque el conocimiento sobre la activación de las células NK en respuesta a citoquinas exógenas está más documentado, las células NK también son capaces de secretar citoquinas proinflamatorias tras el encuentro con células diana ²⁹⁸. En línea con los resultados anteriores, también disminuye la producción IFNγ tras activación con la línea tumoral K562 cuando se inhibe la señalización BMP.

Por otro lado, el estudio del fenotipo y la capacidad citotóxica de las células NK tras su activación en presencia de DMH1 también muestra la importancia de la vía de señalización en

este aspecto clave de la funcionalidad de estas células. El bloqueo de la ruta de señalización BMP durante la activación disminuye dramáticamente su actividad citotóxica, aunque parece no tener efecto sobre la fase lítica.

Como ya se ha visto a lo largo del presente trabajo, la relación recíproca que se establece entre las células NK y las DCs es clave en la respuesta inmune ^{28,138,139}). Ya hemos comentado con anterioridad el papel que podrían jugar las DCs en la activación de las células NK, sin embargo, las células NK también son capaces de influir en la biología de las DCs puesto que pueden inducir su maduración y su capacidad inmunoestimuladora, pero también bajo condiciones de inflamación las células NK pueden lisar las DCs inmaduras con el objetivo de prevenir la inducción de tolerancia. El hecho de que tenga lugar un proceso u otro depende, entre otras razones, del ambiente y del ratio entre ambas poblaciones ^{28,138,139,318}).

Los datos presentados en este trabajo indican que el proceso de maduración de DCs inducido por las células NK activadas también se ve afectado cuando las células NK son estimuladas en presencia del inhibidor de la vía de señalización BMP, puesto que estas células no son capaces de inducir correctamente la maduración de DCs inmaduras. Este fallo en la maduración de las DCs podría modificar la respuesta de otros tipos celulares, como los linfocitos T citotóxicos, puesto que las células NK pueden influir directa o indirectamente en la presentación antigénica cruzada de las DCs con células CD8⁺, como ha sido descrito en humano mediante modelos *in vitro* de presentación cruzada contra antígenos tumorales ^{139,319,320}. De esta forma, se generaría una respuesta inmune deficiente contra el tumor.

Por tanto, nuestros datos muestran que la señalización BMP actúa a múltiples niveles en la funcionalidad de las células NK, viéndose severamente comprometida cuando la vía de señalización es bloqueada, lo cual podría acarrear graves consecuencias por ejemplo bajo un ambiente tumoral. En este contexto, resultados no incluidos en este trabajo, pero publicados recientemente por nuestro grupo ³²¹, muestran que células NK residentes en la médula ósea de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) de alto riesgo, así como pacientes que han sufrido una recaída, tienen una expresión reducida de BMPRIA ³²¹. Estas células presentan además una menor expresión de marcadores de activación, como CD69 o de receptores activadores como NKp30 o NKp46, mientras que expresan mayores niveles de receptores inhibidores como NK2GA o KIRD2L2/L3. Por tanto, menores niveles de expresión para BMPRIA se correlacionan con células que presentan un balance de receptores activadores/receptores inhibidores significativamente reducido ³²¹.

Aunque serían necesarios más resultados, estos datos podrían sugerir que las células NK de pacientes con determinados tipos de cáncer podrían tener una menor capacidad para responder a ligandos BMP, lo cual podría influir en su estado de activación y en su capacidad funcional para establecer una respuesta inmune competente capaz de erradicar el tumor.

Además, la presencia de Noggin u otros inhibidores de la vía de señalización BMP en el ambiente tumoral tal y como han sido descritos previamente ³²²⁻³²⁴, podría suponer un mecanismo de escape de las células tumorales, puesto que la funcionalidad de las células NK podría verse gravemente afectada tal y como muestran nuestros resultados.

Aunque son muchas las cuestiones que quedan por resolver, estos resultados abren la posibilidad de la utilización de la vía de señalización BMP en las células NK como herramienta inmunoterapéutica.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados del presente trabajo podemos concluir:

1. La expresión de BMPRIA identifica en el timo humano una subpoblación de precursores con capacidad para diferenciar fundamentalmente a células NK.
2. En humano, la señalización BMP promueve la diferenciación de las células NK intratímicas regulando positivamente la expresión de factores de transcripción *master* así como la expresión de los componentes del receptor para IL-15. Asimismo, regula junto con IL-15, la proliferación y la supervivencia de las células NK intratímicas siendo además necesaria para la adquisición de sus capacidades funcionales.
3. Las células NK diferenciadas en el timo se mantendrían en el órgano como una población de células NK residentes con características fenotípicas y funcionales específicas, que incluyen la producción tras activación de las quimioquinas XCL1, CXCL10, CCL2 y CCL5 así como una reducida capacidad citotóxica.
4. La señalización BMP autocrina es requerida para la funcionalidad de las células NK periféricas, incluyendo su capacidad proliferativa, la producción de factores solubles así como su actividad citotóxica y su capacidad para activar DCs autólogas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T. & Lavrin, D.H. *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. Int J Cancer* 16, 230-239 **(1975)**.
2. Herberman, R.B., Nunn, M.E. & Lavrin, D.H. *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int J Cancer* 16, 216-229 **(1975)**.
3. Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5, 117-121 **(1975)**.
4. Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5, 112-117 **(1975)**.
5. Rosenberg, E.B., McCoy, J.L., Green, S.S., Donnelly, F.C., Siwarski, D.F., Levine, P.H. & Herberman, R.B. *Destruction of human lymphoid tissue-culture cell lines by human peripheral lymphocytes in 51Cr-release cellular cytotoxicity assays. J Natl Cancer Inst* 52, 345-352 **(1974)**.
6. Di Santo, J.P. *Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. Annu Rev Immunol* 24, 257-286 **(2006)**.
7. Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M. & et al. *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell* 68, 855-867 **(1992)**.
8. Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M. & Ugolini, S. *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science* 331, 44-49 **(2011)**.
9. Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., Powrie, F. & Vivier, E. *Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. Nat Rev Immunol* 13, 145-149 **(2013)**.
10. Freud, A.G., Yu, J. & Caligiuri, M.A. *Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. Semin Immunol* 26, 132-137 **(2014)**.
11. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E. & Caligiuri, M.A. *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood* 97, 3146-3151 **(2001)**.
12. Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S. & Phillips, J.H. *Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. J Immunol* 143, 3183-3191 **(1989)**.
13. Caligiuri, M.A. *Human natural killer cells. Blood* 112, 461-469 **(2008)**.
14. Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. *The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol* 22, 633-640 **(2001)**.
15. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. *Functions of natural killer cells. Nat Immunol* 9, 503-510 **(2008)**.
16. Ljunggren, H.G. & Karre, K. *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today* 11, 237-244 **(1990)**.
17. Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G. & Long, E.O. *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. Immunol Rev* 214, 73-91 **(2006)**.
18. Knorr, D.A., Bachanova, V., Verneris, M.R. & Miller, J.S. *Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. Semin Immunol* 26, 161-172 **(2014)**.
19. Vilches, C. & Parham, P. *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. Annu Rev Immunol* 20, 217-251 **(2002)**.
20. Vivier, E., Nunes, J.A. & Vely, F. *Natural killer cell signaling pathways. Science* 306, 1517-1519 **(2004)**.
21. Freud, A.G. & Caligiuri, M.A. *Human natural killer cell development. Immunol Rev* 214, 56-72 **(2006)**.

22. Raulet, D.H., Vance, R.E. & McMahon, C.W. *Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. Annu Rev Immunol* 19, 291-330 **(2001)**.
23. Bottino, C., Moretta, L., Pende, D., Vitale, M. & Moretta, A. *Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. Mol Immunol* 41, 569-575 **(2004)**.
24. Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, L. *Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. Immunol Today* 21, 228-234 **(2000)**.
25. Bellora, F., Castriconi, R., Dondero, A., Carrega, P., Mantovani, A., Ferlazzo, G., Moretta, A. & Bottino, C. *Human NK cells and NK receptors. Immunol Lett* 161, 168-173 **(2014)**.
26. Moretta, L., Pietra, G., Montaldo, E., Vacca, P., Pende, D., Falco, M., Del Zotto, G., Locatelli, F., Moretta, A. & Mingari, M.C. *Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. Front Immunol* 5, 87 **(2014)**.
27. Lanier, L.L. *NK cell recognition. Annu Rev Immunol* 23, 225-274 **(2005)**.
28. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L. & Vivier, E. *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". Blood* 106, 2252-2258 **(2005)**.
29. Bonavida, B. *NK cell phenotypic and functional heterogeneities and molecular mechanisms of cytotoxicity. Crit Rev Oncog* 19, 21-45 **(2014)**.
30. Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R. & Lascrain, R. *Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cell Mol Immunol* 6, 15-25 **(2009)**.
31. Takata, H. & Takiguchi, M. *Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. J Immunol* 177, 4330-4340 **(2006)**.
32. Voskoboinik, I., Thia, M.C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M.J. & Trapani, J.A. *Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. J Biol Chem* 280, 8426-8434 **(2005)**.
33. Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A. & Trapani, J.A. *Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. Immunol Cell Biol* 84, 72-78 **(2006)**.
34. Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C. & Sun, P.D. *The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. J Biol Chem* 276, 16469-16477 **(2001)**.
35. Lanier, L.L. *NK cell receptors. Annu Rev Immunol* 16, 359-393 **(1998)**.
36. Falschlehner, C., Schaefer, U. & Walczak, H. *Following TRAIL's path in the immune system. Immunology* 127, 145-154 **(2009)**.
37. Song, K., Chen, Y., Goke, R., Wilmen, A., Seidel, C., Goke, A. & Hilliard, B. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. J Exp Med* 191, 1095-1104 **(2000)**.
38. Yu, J., Freud, A.G. & Caligiuri, M.A. *Location and cellular stages of natural killer cell development. Trends Immunol* 34, 573-582.
39. Blom, B. & Spits, H. *Development of human lymphoid cells. Annu Rev Immunol* 24, 287-320 **(2006)**.
40. Haddad, R., Guardiola, P., Izac, B., Thibault, C., Radich, J., Delezoide, A.L., Baillou, C., Lemoine, F.M., Gluckman, J.C., Pflumio, F. & Canque, B. *Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. Blood* 104, 3918-3926 **(2004)**.
41. Miller, J.S., Alley, K.A. & McGlave, P. *Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. Blood* 83, 2594-2601 **(1994)**.

42. Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., Guimond, M. & Caligiuri, M.A. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22, 295-304 (2005).
43. Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K. & Caligiuri, M.A. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203, 1033-1043 (2006).
44. McClory, S., Hughes, T., Freud, A.G., Briercheck, E.L., Martin, C., Trimboli, A.J., Yu, J., Zhang, X., Leone, G., Nuovo, G. & Caligiuri, M.A. Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil. *J Clin Invest* 122, 1403-1415 (2012).
45. Chiossone, L., Vacca, P., Orecchia, P., Croxatto, D., Damonte, P., Astigiano, S., Barbieri, O., Bottino, C., Moretta, L. & Mingari, M.C. In vivo generation of decidual natural killer cells from resident hematopoietic progenitors. *Haematologica* 99, 448-457 (2014).
46. Vacca, P., Vitale, C., Montaldo, E., Conte, R., Cantoni, C., Fulcheri, E., Darretta, V., Moretta, L. & Mingari, M.C. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2402-2407 (2011).
47. Luetke-Eversloh, M., Killig, M. & Romagnani, C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Front Immunol* 4, 499 (2013).
48. Cichocki, F., Sitnicka, E. & Bryceson, Y.T. NK cell development and function--plasticity and redundancy unleashed. *Semin Immunol* 26, 114-126 (2014).
49. Huntington, N.D., Vosshenrich, C.A. & Di Santo, J.P. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 7, 703-714 (2007).
50. Eissens, D.N., Spanholtz, J., van der Meer, A., van Cranenbroek, B., Dolstra, H., Kwekkeboom, J., Preijers, F.W. & Joosten, I. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One* 7, e30930 (2012).
51. Grzywacz, B., Kataria, N., Sikora, M., Oostendorp, R.A., Dzierzak, E.A., Blazar, B.R., Miller, J.S. & Verneris, M.R. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood* 108, 3824-3833 (2006).
52. Perussia, B., Chen, Y. & Loza, M.J. Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol Immunol* 42, 385-395 (2005).
53. Chan, A., Hong, D.L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T. & Bowness, P. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 179, 89-94 (2007).
54. Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H. & Di Santo, J.P. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* 206, 25-34 (2009).
55. Ouyang, Q., Baerlocher, G., Vulto, I. & Lansdorp, P.M. Telomere length in human natural killer cell subsets. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 240-252 (2007).
56. Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Munz, C., Thiel, A., Moretta, L. & Ferlazzo, G. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178, 4947-4955 (2007).
57. Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., Peffault de Latour, R., Robin, M., Carmagnat, M., Loiseau, P., Tamouza, R., Scieux, C., Rabian, C., Di Santo, J.P., Charron, D., Janin, A., Socie, G. & Toubert, A. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset

- dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. J Immunol* 181, 2227-2237 **(2008)**.
58. Beziat, V., Descours, B., Parizot, C., Debre, P. & Vieillard, V. *NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. PLoS One* 5, e11966 **(2010)**.
 59. Bjorkstrom, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Bjorklund, A.T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M.E., Guzman, C.A., Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. *Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. Blood* 116, 3853-3864 **(2010)**.
 60. Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F. & Lanier, L.L. *CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. Blood* 116, 3865-3874 **(2010)**.
 61. Yu, J., Mao, H.C., Wei, M., Hughes, T., Zhang, J., Park, I.K., Liu, S., McClory, S., Marcucci, G., Trotta, R. & Caligiuri, M.A. *CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. Blood* 115, 274-281 **(2010)**.
 62. Juelke, K., Killig, M., Luetke-Eversloh, M., Parente, E., Gruen, J., Morandi, B., Ferlazzo, G., Thiel, A., Schmitt-Knosalla, I. & Romagnani, C. *CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. Blood* 116, 1299-1307 **(2010)**.
 63. Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S. & Vivier, E. *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. Immunity* 25, 331-342 **(2006)**.
 64. Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H. & Yokoyama, W.M. *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. Nature* 436, 709-713 **(2005)**.
 65. Hoglund, P. & Brodin, P. *Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. Nat Rev Immunol* 10, 724-734 **(2010)**.
 66. Orr, M.T. & Lanier, L.L. *Natural killer cell education and tolerance. Cell* 142, 847-856 **(2010)**.
 67. Yokoyama, W.M. & Kim, S. *How do natural killer cells find self to achieve tolerance? Immunity* 24, 249-257 **(2006)**.
 68. Min-Oo, G., Kamimura, Y., Hendricks, D.W., Nabekura, T. & Lanier, L.L. *Natural killer cells: walking three paths down memory lane. Trends Immunol* 34, 251-258 **(2013)**.
 69. Sun, J.C., Beilke, J.N. & Lanier, L.L. *Adaptive immune features of natural killer cells. Nature* 457, 557-561 **(2009)**.
 70. Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Anasetti, C., Weisdorf, D. & Miller, J.S. *Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. J Immunol* 189, 5082-5088 **(2012)**.
 71. Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Verges, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D. & Miller, J.S. *Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. Blood* 119, 2665-2674 **(2012)**.
 72. Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.M., Norris, P.J., Nixon, D.F. & Lanier, L.L. *Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14725-14732.

73. Romee, R., Schneider, S.E., Leong, J.W., Chase, J.M., Keppel, C.R., Sullivan, R.P., Cooper, M.A. & Fehniger, T.A. *Cytokine activation induces human memory-like NK cells. Blood* 120, 4751-4760 **(2012)**.
74. Montaldo, E., Vacca, P., Moretta, L. & Mingari, M.C. *Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. Semin Immunol* 26, 107-113 **(2014)**.
75. Daussy, C., Faure, F., Mayol, K., Viel, S., Gasteiger, G., Charrier, E., Bienvenu, J., Henry, T., Debien, E., Hasan, U.A., Marvel, J., Yoh, K., Takahashi, S., Prinz, I., de Bernard, S., Buffat, L. & Walzer, T. *T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. J Exp Med* 211, 563-577 **(2014)**.
76. Gascoyne, D.M., Long, E., Veiga-Fernandes, H., de Boer, J., Williams, O., Seddon, B., Coles, M., Kioussis, D. & Brady, H.J. *The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. Nat Immunol* 10, 1118-1124 **(2009)**.
77. Kamizono, S., Duncan, G.S., Seidel, M.G., Morimoto, A., Hamada, K., Grosveld, G., Akashi, K., Lind, E.F., Haight, J.P., Ohashi, P.S., Look, A.T. & Mak, T.W. *Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. J Exp Med* 206, 2977-2986 **(2009)**.
78. Ramirez, K., Chandler, K.J., Spaulding, C., Zandi, S., Sigvardsson, M., Graves, B.J. & Kee, B.L. *Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. Immunity* 36, 921-932 **(2012)**.
79. Boos, M.D., Yokota, Y., Eberl, G. & Kee, B.L. *Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. J Exp Med* 204, 1119-1130 **(2007)**.
80. Heemskerk, M.H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A.P., Bakker, A.Q., Weijer, K., Res, P.C. & Spits, H. *Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. J Exp Med* 186, 1597-1602 **(1997)**.
81. Schotte, R., Dontje, W., Nagasawa, M., Yasuda, Y., Bakker, A.Q., Spits, H. & Blom, B. *Synergy between IL-15 and Id2 promotes the expansion of human NK progenitor cells, which can be counteracted by the E protein HEB required to drive T cell development. J Immunol* 184, 6670-6679 **(2010)**.
82. Seillet, C., Rankin, L.C., Groom, J.R., Mielke, L.A., Tellier, J., Chopin, M., Huntington, N.D., Belz, G.T. & Carotta, S. *Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. J Exp Med* 211, 1733-1740 **(2014)**.
83. Male, V., Nisoli, I., Kostrzewski, T., Allan, D.S., Carlyle, J.R., Lord, G.M., Wack, A. & Brady, H.J. *The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. J Exp Med* 211, 635-642 **(2014)**.
84. Seillet, C., Huntington, N.D., Gangatirkar, P., Axelsson, E., Minnich, M., Brady, H.J., Busslinger, M., Smyth, M.J., Belz, G.T. & Carotta, S. *Differential requirement for Nfil3 during NK cell development. J Immunol* 192, 2667-2676 **(2014)**.
85. Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y. & Rao, A. *Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. J Exp Med* 206, 51-59 **(2009)**.
86. Lai, C.B. & Mager, D.L. *Role of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) in transcription regulation of natural cytotoxicity receptor 1 (NCR1/NKp46), an activating natural killer (NK) cell receptor. J Biol Chem* 287, 7324-7334 **(2012)**.
87. Samson, S.I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Colucci, F., Buer, J., Grosveld, F., Godin, I. & Di Santo, J.P. *GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. Immunity* 19, 701-711 **(2003)**.
88. Vosshenrich, C.A., Garcia-Ojeda, M.E., Samson-Villeger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., Rogge, L., Ezine, S. & Di Santo, J.P. *A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. Nat Immunol* 7, 1217-1224 **(2006)**.

89. Crotta, S., Gkioka, A., Male, V., Duarte, J.H., Davidson, S., Nisoli, I., Brady, H.J. & Wack, A. *The transcription factor E4BP4 is not required for extramedullary pathways of NK cell development. J Immunol* 192, 2677-2688 **(2014)**.
90. Gordon, S.M., Chaix, J., Rupp, L.J., Wu, J., Madera, S., Sun, J.C., Lindsten, T. & Reiner, S.L. *The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. Immunity* 36, 55-67 **(2012)**.
91. Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H. & Caligiuri, M.A. *A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. J Clin Invest* 99, 937-943 **(1997)**.
92. Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K. & Caligiuri, M.A. *Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. J Exp Med* 180, 1395-1403 **(1994)**.
93. Mrozek, E., Anderson, P. & Caligiuri, M.A. *Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood* 87, 2632-2640 **(1996)**.
94. Yu, H., Fehniger, T.A., Fuchshuber, P., Thiel, K.S., Vivier, E., Carson, W.E. & Caligiuri, M.A. *Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. Blood* 92, 3647-3657 **(1998)**.
95. Carson, W.E., Haldar, S., Baiocchi, R.A., Croce, C.M. & Caligiuri, M.A. *The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7553-7557 **(1994)**.
96. Giri, J.G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L.S., Cosman, D. & Anderson, D. *Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. EMBO J* 13, 2822-2830 **(1994)**.
97. Giri, J.G., Anderson, D.M., Kumaki, S., Park, L.S., Grabstein, K.H. & Cosman, D. *IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. J Leukoc Biol* 57, 763-766 **(1995)**.
98. Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L.S. & Anderson, D.M. *Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. EMBO J* 14, 3654-3663 **(1995)**.
99. Castillo, E.F. & Schluns, K.S. *Regulating the immune system via IL-15 transpresentation. Cytokine* 59, 479-490 **(2012)**.
100. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. *IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. Immunity* 17, 537-547 **(2002)**.
101. Stonier, S.W. & Schluns, K.S. *Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. Immunol Lett* 127, 85-92 **(2010)**.
102. Drexler, H.G. & Quentmeier, H. *FLT3: receptor and ligand. Growth Factors* 22, 71-73 **(2004)**.
103. Gibson, F.M., Scopes, J., Daly, S., Rizzo, S., Ball, S.E. & Gordon-Smith, E.C. *IL-3 is produced by normal stroma in long-term bone marrow cultures. Br J Haematol* 90, 518-525 **(1995)**.
104. Lyman, S.D. & Jacobsen, S.E. *c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. Blood* 91, 1101-1134 **(1998)**.
105. Pillai, M., Torok-Storb, B. & Iwata, M. *Expression and function of IL-7 receptors in marrow stromal cells. Leuk Lymphoma* 45, 2403-2408 **(2004)**.
106. Guimond, M., Freud, A.G., Mao, H.C., Yu, J., Blaser, B.W., Leong, J.W., Vandeusen, J.B., Dorrance, A., Zhang, J., Mackall, C.L. & Caligiuri, M.A. *In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. J Immunol* 184, 2769-2775 **(2010)**.
107. Chinen, H., Matsuoka, K., Sato, T., Kamada, N., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kobayashi, T., Hasegawa, H., Sugita, A., Kinjo, F., Fujita, J. & Hibi, T. *Lamina propria c-kit+ immune*

- precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells. Gastroenterology* 133, 559-573 **(2007)**.
108. Mingari, M.C., Poggi, A., Biassoni, R., Bellomo, R., Ciccone, E., Pella, N., Morelli, L., Verdiani, S., Moretta, A. & Moretta, L. *In vitro proliferation and cloning of CD3- CD16+ cells from human thymocyte precursors. J Exp Med* 174, 21-26 **(1991)**.
 109. Moroso, V., Famili, F., Papazian, N., Cupedo, T., van der Laan, L.J., Kazemier, G., Metselaar, H.J. & Kwekkeboom, J. *NK cells can generate from precursors in the adult human liver. Eur J Immunol* 41, 3340-3350 **(2011)**.
 110. Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Yamaguchi, S., Sakamori, R., Hiramatsu, N., Kanto, T., Ohkawa, K. & Hayashi, N. *Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities. Immunology* 120, 73-82 **(2007)**.
 111. Koopman, L.A., Kopcow, H.D., Rybalov, B., Boyson, J.E., Orange, J.S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C.J., Schachter, A.D., Park, P.J. & Strominger, J.L. *Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. J Exp Med* 198, 1201-1212 **(2003)**.
 112. Sharma, R. & Das, A. *Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans. Immunol Res* 58, 125-131 **(2014)**.
 113. Sun, H., Sun, C., Tian, Z. & Xiao, W. *NK cells in immunotolerant organs. Cell Mol Immunol* 10, 202-212 **(2013)**.
 114. Langers, I., Renoux, V.M., Thiry, M., Delvenne, P. & Jacobs, N. *Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. Biologics* 6, 73-82 **(2012)**.
 115. Cerwenka, A., Baron, J.L. & Lanier, L.L. *Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11521-11526 **(2001)**.
 116. Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M. & Raulet, D.H. *Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. Nature* 413, 165-171 **(2001)**.
 117. Kelly, J.M., Darcy, P.K., Markby, J.L., Godfrey, D.I., Takeda, K., Yagita, H. & Smyth, M.J. *Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. Nat Immunol* 3, 83-90 **(2002)**.
 118. Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M. & Hayakawa, Y. *NKG2D function protects the host from tumor initiation. J Exp Med* 202, 583-588 **(2005)**.
 119. Street, S.E., Hayakawa, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., MacGregor, D., Jamieson, A.M., Diefenbach, A., Yagita, H., Godfrey, D.I. & Smyth, M.J. *Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. J Exp Med* 199, 879-884 **(2004)**.
 120. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. Lancet* 356, 1795-1799 **(2000)**.
 121. Jovic, V., Konjevic, G., Radulovic, S., Jelic, S. & Spuzic, I. *Impaired perforin-dependent NK cell cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma. Tumori* 87, 324-329 **(2001)**.
 122. Markowitz, J.F., Aiges, H.W., Cunningham-Rundles, S., Kahn, E., Teichberg, S., Fisher, S.E. & Daum, F. *Cancer family syndrome: marker studies. Gastroenterology* 91, 581-589 **(1986)**.
 123. Warren, R.P., Stembridge, A.M. & Gardner, E.J. *Deficient immune function of peripheral blood mononuclear cells from patients with Gardner syndrome. Clin Exp Immunol* 60, 525-531 **(1985)**.
 124. Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, M.F. & Velardi, A. *Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. Immunol Rev* 214, 202-218 **(2006)**.

125. Jost, S. & Altfeld, M. *Control of human viral infections by natural killer cells. Annu Rev Immunol* 31, 163-194 **(2013)**.
126. Nash, W.T., Teoh, J., Wei, H., Gamache, A. & Brown, M.G. *Know Thyself: NK-Cell Inhibitory Receptors Prompt Self-Tolerance, Education, and Viral Control. Front Immunol* 5, 175 **(2014)**.
127. Ivanova, D., Krempels, R., Ryfe, J., Weitzman, K., Stephenson, D. & Gigley, J.P. *NK Cells in Mucosal Defense against Infection. Biomed Res Int* 2014, 413982 **(2014)**.
128. Ennis, F.A., Meager, A., Beare, A.S., Qi, Y.H., Riley, D., Schwarz, G., Schild, G.C. & Rook, A.H. *Interferon induction and increased natural killer-cell activity in influenza infections in man. Lancet* 2, 891-893 **(1981)**.
129. Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W. & Porgador, A. *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature* 409, 1055-1060 **(2001)**.
130. Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A. & Lopez-Botet, M. *Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. Blood* 107, 3624-3631 **(2006)**.
131. Guma, M., Cabrera, C., Erkizia, I., Bofill, M., Clotet, B., Ruiz, L. & Lopez-Botet, M. *Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. J Infect Dis* 194, 38-41 **(2006)**.
132. Heatley, S.L., Pietra, G., Lin, J., Widjaja, J.M., Harpur, C.M., Lester, S., Rossjohn, J., Szer, J., Schwarer, A., Bradstock, K., Bardy, P.G., Mingari, M.C., Moretta, L., Sullivan, L.C. & Brooks, A.G. *Polymorphism in human cytomegalovirus UL40 impacts on recognition of human leukocyte antigen-E (HLA-E) by natural killer cells. J Biol Chem* 288, 8679-8690 **(2013)**.
133. Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F.L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G. & Campa, M. *Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. Infect Immun* 76, 1719-1727 **(2008)**.
134. Islam, A., Li, S.S., Oykhman, P., Timm-McCann, M., Huston, S.M., Stack, D., Xiang, R.F., Kelly, M.M. & Mody, C.H. *An acidic microenvironment increases NK cell killing of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by enhancing perforin degranulation. PLoS Pathog* 9, e1003439 **(2013)**.
135. Korbel, D.S., Newman, K.C., Almeida, C.R., Davis, D.M. & Riley, E.M. *Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J Immunol* 175, 7466-7473 **(2005)**.
136. Lanier, L.L. *Evolutionary struggles between NK cells and viruses. Nat Rev Immunol* 8, 259-268 **(2008)**.
137. Lodoen, M.B. & Lanier, L.L. *Natural killer cells as an initial defense against pathogens. Curr Opin Immunol* 18, 391-398 **(2006)**.
138. Chijioke, O. & Munz, C. *Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation. Front Immunol* 4, 365 **(2013)**.
139. Ferlazzo, G. & Morandi, B. *Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. Front Immunol* 5, 159 **(2014)**.
140. Mailliard, R.B., Son, Y.I., Redlinger, R., Coates, P.T., Giermasz, A., Morel, P.A., Storkus, W.J. & Kalinski, P. *Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. J Immunol* 171, 2366-2373 **(2003)**.
141. Agaoglu, S., Marcenaro, E., Ferranti, B., Moretta, L. & Moretta, A. *Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. Blood* 112, 1776-1783 **(2008)**.

142. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. & Trinchieri, G. *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. J Exp Med* 195, 327-333 **(2002)**.
143. Morandi, B., Mortara, L., Carrega, P., Cantoni, C., Costa, G., Accolla, R.S., Mingari, M.C., Ferrini, S., Moretta, L. & Ferlazzo, G. *NK cells provide helper signal for CD8+ T cells by inducing the expression of membrane-bound IL-15 on DCs. Int Immunol* 21, 599-606 **(2009)**.
144. Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L. & Moretta, A. *NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. Blood* 106, 566-571 **(2005)**.
145. Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M. & Munz, C. *Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. J Exp Med* 195, 343-351 **(2002)**.
146. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol* 1, 311-316 **(2000)**.
147. Moretta, A. *Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. Nat Rev Immunol* 2, 957-964 **(2002)**.
148. Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M.C. & Moretta, L. *Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. Eur J Immunol* 44, 1582-1592 **(2014)**.
149. Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D. & Smyth, M.J. *Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu Rev Immunol* 29, 235-271 **(2011)**.
150. Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D. & Smyth, M.J. *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol* 27, 16-25 **(2014)**.
151. Pradeu, T., Jaeger, S. & Vivier, E. *The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? Nat Rev Immunol* 13, 764-769 **(2013)**.
152. Biswas, S.K. & Mantovani, A. *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol* 11, 889-896 **(2010)**.
153. Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol* 12, 253-268 **(2012)**.
154. Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., Moretta, L., Mingari, M.C. & Vitale, M. *Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20847-20852 **(2009)**.
155. Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. *Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4120-4125 **(2003)**.
156. Halama, N., Michel, S., Kloor, M., Zoernig, I., Benner, A., Spille, A., Pommerencke, T., von Knebel, D.M., Folprecht, G., Lubert, B., Feyen, N., Martens, U.M., Beckhove, P., Gnjatic, S., Schirmacher, P., Herpel, E., Weitz, J., Grabe, N. & Jaeger, D. *Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. Cancer Res* 71, 5670-5677 **(2011)**.
157. Sconocchia, G., Spagnoli, G.C., Del Principe, D., Ferrone, S., Anselmi, M., Wongsena, W., Cervelli, V., Schultz-Thater, E., Wyler, S., Carafa, V., Moch, H., Terracciano, L. & Tornillo, L. *Defective infiltration of natural killer cells in MICA/B-positive renal cell carcinoma involves beta(2)-integrin-mediated interaction. Neoplasia* 11, 662-671 **(2009)**.

158. Matsuoka, K., Koreth, J., Kim, H.T., Bascug, G., McDonough, S., Kawano, Y., Murase, K., Cutler, C., Ho, V.T., Alyea, E.P., Armand, P., Blazar, B.R., Antin, J.H., Soiffer, R.J. & Ritz, J. *Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. Sci Transl Med* 5, 179ra143 **(2013)**.
159. Sim, G.C., Martin-Orozco, N., Jin, L., Yang, Y., Wu, S., Washington, E., Sanders, D., Lacey, C., Wang, Y., Vence, L., Hwu, P. & Radvanyi, L. *IL-2 therapy promotes suppressive ICOS⁺ Treg expansion in melanoma patients. J Clin Invest* 124, 99-110 **(2014)**.
160. Waldmann, T.A., Dubois, S. & Tagaya, Y. *Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. Immunity* 14, 105-110 **(2001)**.
161. Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debre, P. & Vieillard, V. *Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. Blood* 122, 2935-2942 **(2013)**.
162. Koehl, U., Brehm, C., Huenecke, S., Zimmermann, S.Y., Kloess, S., Bremm, M., Ullrich, E., Soerensen, J., Quaiser, A., Erben, S., Wunram, C., Gardlowski, T., Auth, E., Tonn, T., Seidl, C., Meyer-Monard, S., Stern, M., Passweg, J., Klingebiel, T., Bader, P., Schwabe, D. & Esser, R. *Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. Front Oncol* 3, 118 **(2013)**.
163. van Ewijk, W., Hollander, G., Terhorst, C. & Wang, B. *Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. Development* 127, 1583-1591 **(2000)**.
164. Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J.M., Ramiro, A.R., Carrasco, Y.R., Lopez-Botet, M. & Toribio, M.L. *Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. Blood* 91, 2760-2771 **(1998)**.
165. Sanchez, M.J., Muench, M.O., Roncarolo, M.G., Lanier, L.L. & Phillips, J.H. *Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. J Exp Med* 180, 569-576 **(1994)**.
166. Taghon, T. & Rothenberg, E.V. *Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alphabeta and TCR-gammadelta T cell development. Semin Immunopathol* 30, 383-398 **(2008)**.
167. Carrasco, Y.R., Trigueros, C., Ramiro, A.R., de Yebenes, V.G. & Toribio, M.L. *Beta-selection is associated with the onset of CD8beta chain expression on CD4(+)CD8alphaalpha(+) pre-T cells during human intrathymic development. Blood* 94, 3491-3498 **(1999)**.
168. Singer, A., Adoro, S. & Park, J.H. *Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. Nat Rev Immunol* 8, 788-801 **(2008)**.
169. Marquez, C., Trigueros, C., Fernandez, E. & Toribio, M.L. *The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. J Exp Med* 181, 475-483 **(1995)**.
170. Res, P., Martinez-Caceres, E., Cristina Jaleco, A., Staal, F., Noteboom, E., Weijer, K. & Spits, H. *CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. Blood* 87, 5196-5206 **(1996)**.
171. Sanchez, M.J., Spits, H., Lanier, L.L. & Phillips, J.H. *Human natural killer cell committed thymocytes and their relation to the T cell lineage. J Exp Med* 178, 1857-1866 **(1993)**.
172. Spits, H. *Development of alphabeta T cells in the human thymus. Nat Rev Immunol* 2, 760-772 **(2002)**.
173. Rodewald, H.R., Moingeon, P., Lucich, J.L., Dosiou, C., Lopez, P. & Reinherz, E.L. *A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells. Cell* 69, 139-150 **(1992)**.
174. Vargas, C.L., Poursine-Laurent, J., Yang, L. & Yokoyama, W.M. *Development of thymic NK cells from double negative 1 thymocyte precursors. Blood* 118, 3570-3578 **(2011)**.

175. Yui, M.A., Feng, N. & Rothenberg, E.V. *Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus*. *J Immunol* 185, 284-293 **(2010)**.
176. Klein Wolterink, R.G., Garcia-Ojeda, M.E., Vosshenrich, C.A., Hendriks, R.W. & Di Santo, J.P. *The intrathymic crossroads of T and NK cell differentiation*. *Immunol Rev* 238, 126-137 **(2010)**.
177. Luther, C., Warner, K. & Takei, F. *Unique progenitors in mouse lymph node develop into CD127+ NK cells: thymus-dependent and thymus-independent pathways*. *Blood* 117, 4012-4021 **(2011)**.
178. De Smedt, M., Taghon, T., Van de Walle, I., De Smet, G., Leclercq, G. & Plum, J. *Notch signaling induces cytoplasmic CD3 epsilon expression in human differentiating NK cells*. *Blood* 110, 2696-2703 **(2007)**.
179. Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M. *Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction*. *J Biochem* 147, 35-51 **(2010)**.
180. Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 251-263 **(2005)**.
181. Urist, M.R. *Bone: formation by autoinduction*. *Science* 150, 893-899 **(1965)**.
182. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. & Wang, E.A. *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. *Science* 242, 1528-1534 **(1988)**.
183. Massague, J. & Chen, Y.G. *Controlling TGF-beta signaling*. *Genes Dev* 14, 627-644 **(2000)**.
184. Reddi, A.H. *BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins*. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 249-250 **(2005)**.
185. Sampath, T.K., Coughlin, J.E., Whetstone, R.M., Banach, D., Corbett, C., Ridge, R.J., Ozkaynak, E., Oppermann, H. & Rueger, D.C. *Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily*. *J Biol Chem* 265, 13198-13205 **(1990)**.
186. Valera, E., Isaacs, M.J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J.C. & Choe, S. *BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells*. *PLoS One* 5, e11167 **(2010)**.
187. Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. & Nohe, A. *Bone morphogenetic proteins: a critical review*. *Cell Signal* 23, 609-620 **(2011)**.
188. Derynck, R. & Zhang, Y.E. *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. *Nature* 425, 577-584 **(2003)**.
189. ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L., Ichijo, H., Heldin, C.H. & Miyazono, K. *Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4*. *J Biol Chem* 269, 16985-16988 **(1994)**.
190. Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U. & Nordheim, A. *Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells*. *J Biol Chem* 274, 19838-19845 **(1999)**.
191. Ito, Y. & Miyazono, K. *RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling*. *Curr Opin Genet Dev* 13, 43-47 **(2003)**.
192. Leboy, P., Grasso-Knight, G., D'Angelo, M., Volk, S.W., Lian, J.V., Drissi, H., Stein, G.S. & Adams, S.L. *Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation*. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1, S15-22 **(2001)**.
193. Miyazono, K. & Miyazawa, K. *Id: a target of BMP signaling*. *Sci STKE* 2002, pe40 **(2002)**.
194. Gazzerro, E. & Canalis, E. *Bone morphogenetic proteins and their antagonists*. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 51-65 **(2006)**.
195. Wu, Q., Sun, C.C., Lin, H.Y. & Babitt, J.L. *Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs)*. *PLoS One* 7, e46307 **(2012)**.

196. Barbara, N.P., Wrana, J.L. & Letarte, M. *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily*. *J Biol Chem* 274, 584-594 **(1999)**.
197. Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. & Niehrs, C. *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. *Nature* 401, 480-485 **(1999)**.
198. Jin, W., Yun, C., Kim, H.S. & Kim, S.J. *TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling*. *Cancer Res* 67, 9869-9877 **(2007)**.
199. Sammar, M., Stricker, S., Schwabe, G.C., Sieber, C., Hartung, A., Hanke, M., Oishi, I., Pohl, J., Minami, Y., Sebald, W., Mundlos, S. & Knaus, P. *Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2*. *Genes Cells* 9, 1227-1238 **(2004)**.
200. Schwappacher, R., Weiske, J., Heining, E., Ezerski, V., Marom, B., Henis, Y.I., Huber, O. & Knaus, P. *Novel crosstalk to BMP signalling: cGMP-dependent kinase I modulates BMP receptor and Smad activity*. *EMBO J* 28, 1537-1550 **(2009)**.
201. Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K. & Miyazawa, K. *Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors*. *J Biol Chem* 282, 20603-20611 **(2007)**.
202. Mochizuki, T., Miyazaki, H., Hara, T., Furuya, T., Imamura, T., Watabe, T. & Miyazono, K. *Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling*. *J Biol Chem* 279, 31568-31574 **(2004)**.
203. Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K. & Imamura, T. *Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads*. *Mol Biol Cell* 14, 2809-2817 **(2003)**.
204. Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.H., Meng, A. & Chen, Y.G. *Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation*. *Mol Cell Biol* 27, 4488-4499 **(2007)**.
205. Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A. & Derynck, R. *Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 974-979 **(2001)**.
206. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. & Thomsen, G.H. *A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation*. *Nature* 400, 687-693 **(1999)**.
207. Alarmo, E.L. & Kallioniemi, A. *Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis?* *Endocr Relat Cancer* 17, R123-139 **(2010)**.
208. Zhao, G.Q. *Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse*. *Genesis* 35, 43-56 **(2003)**.
209. Marks-Bluth, J. & Pimanda, J.E. *Cell signalling pathways that mediate haematopoietic stem cell specification*. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 2175-2184 **(2012)**.
210. Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L. & Dick, J.E. *Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells*. *J Exp Med* 189, 1139-1148 **(1999)**.
211. Detmer, K. & Walker, A.N. *Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors*. *Cytokine* 17, 36-42 **(2002)**.
212. Larsson, J. & Karlsson, S. *The role of Smad signaling in hematopoiesis*. *Oncogene* 24, 5676-5692 **(2005)**.
213. Bleul, C.C. & Boehm, T. *BMP signaling is required for normal thymus development*. *J Immunol* 175, 5213-5221 **(2005)**.

214. Soza-Ried, C., Bleul, C.C., Schorpp, M. & Boehm, T. *Maintenance of thymic epithelial phenotype requires extrinsic signals in mouse and zebrafish. J Immunol* 181, 5272-5277 **(2008)**.
215. Outram, S.V., Varas, A., Pepicelli, C.V. & Crompton, T. *Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. Immunity* 13, 187-197 **(2000)**.
216. Graf, D., Nethisinghe, S., Palmer, D.B., Fisher, A.G. & Merckenschlager, M. *The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. J Exp Med* 196, 163-171 **(2002)**.
217. Tsai, P.T., Lee, R.A. & Wu, H. *BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. Blood* 102, 3947-3953 **(2003)**.
218. Hager-Theodorides, A.L., Outram, S.V., Shah, D.K., Sacedon, R., Shrimpton, R.E., Vicente, A., Varas, A. & Crompton, T. *Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. J Immunol* 169, 5496-5504 **(2002)**.
219. Passa, O., Tsalavos, S., Belyaev, N.N., Petryk, A., Potocnik, A.J. & Graf, D. *Compartmentalization of bone morphogenetic proteins and their antagonists in lymphoid progenitors and supporting microenvironments and functional implications. Immunology* 134, 349-359 **(2011)**.
220. Hager-Theodorides, A.L., Ross, S.E., Sahni, H., Mishina, Y., Furmanski, A.L. & Crompton, T. *Direct BMP2/4 signaling through BMP receptor 1A regulates fetal thymocyte progenitor homeostasis and differentiation to CD4+CD8+ double-positive cell. Cell Cycle* 13, 324-333 **(2014)**.
221. Cejalvo, T., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Diez, B., Gutierrez-Frias, C., Valencia, J., Zapata, A.G., Varas, A. & Vicente, A. *Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. Immunology* 121, 94-104 **(2007)**.
222. Varas A., M.V., Hernández-López C., Hidalgo L., Entrena A., Valencia J., Zapata A., Sacedón R., Vicente A. *Role of BMP signalling in peripheral CD4+ T cell proliferation. Inmunología* 28, 125-130 **(2009)**.
223. Yoshioka, Y., Ono, M., Osaki, M., Konishi, I. & Sakaguchi, S. *Differential effects of inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. Eur J Immunol* 42, 749-759 **(2012)**.
224. Sivertsen, E.A., Huse, K., Hystad, M.E., Kersten, C., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. Eur J Immunol* 37, 2937-2948 **(2007)**.
225. Lu, L., Ma, J., Wang, X., Wang, J., Zhang, F., Yu, J., He, G., Xu, B., Brand, D.D., Horwitz, D.A., Shi, W. & Zheng, S.G. *Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg. Eur J Immunol* 40, 142-152 **(2010)**.
226. Takai, S., Tokuda, H., Matsushima-Nishiwaki, R., Saio, M., Takami, T. & Kozawa, O. *TGF-beta superfamily enhances the antigen-induced IFN-gamma production by effector/memory CD8+ T cells. Int J Mol Med* 25, 105-111 **(2010)**.
227. Zetterblad, J., Qian, H., Zandi, S., Mansson, R., Lagergren, A., Hansson, F., Bryder, D., Paulsson, N. & Sigvardsson, M. *Genomics based analysis of interactions between developing B-lymphocytes and stromal cells reveal complex interactions and two-way communication. BMC Genomics* 11, 108 **(2010)**.
228. Kersten, C., Dosen, G., Myklebust, J.H., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Smeland, E.B. & Rian, E. *BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3. Exp Hematol* 34, 72-81 **(2006)**.
229. Huse, K., Bakkebo, M., Oksvold, M.P., Forfang, L., Hilden, V.I., Stokke, T., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *Bone morphogenetic proteins inhibit CD40L/IL-21-induced Ig*

- production in human B cells: differential effects of BMP-6 and BMP-7. *Eur J Immunol* 41, 3135-3145 (2011).
230. Kersten, C., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Forfang, L., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. BMC Immunol* 6, 9 (2005).
 231. Tsalavos, S., Segklia, K., Passa, O., Petryk, A., O'Connor, M.B. & Graf, D. *Involvement of twisted gastrulation in T cell-independent plasma cell production. J Immunol* 186, 6860-6870 (2011).
 232. Hong, J.H., Lee, G.T., Lee, J.H., Kwon, S.J., Park, S.H., Kim, S.J. & Kim, I.Y. *Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. Immunology* 128, e442-450 (2009).
 233. Bhat, A., Wooten, R.M. & Jayasuriya, A.C. *Secretion of growth factors from macrophages when cultured with microparticles. J Biomed Mater Res A* 101, 3170-3180 (2013).
 234. Chung, J.H., Jeon, H.J., Hong, S.Y., Lee da, L., Lee, K.H., Kim, S.H., Han, Y.S., Manabe, I., Miller, Y.I. & Lee, S.H. *Palmitate promotes the paracrine effects of macrophages on vascular smooth muscle cells: the role of bone morphogenetic proteins. PLoS One* 7, e29100 (2012).
 235. Kwon, S.J., Lee, G.T., Lee, J.H., Kim, W.J. & Kim, I.Y. *Bone morphogenetic protein-6 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages. Immunology* 128, e758-765 (2009).
 236. Lee, G.T., Kwon, S.J., Lee, J.H., Jeon, S.S., Jang, K.T., Choi, H.Y., Lee, H.M., Kim, W.J., Kim, S.J. & Kim, I.Y. *Induction of interleukin-6 expression by bone morphogenetic protein-6 in macrophages requires both SMAD and p38 signaling pathways. J Biol Chem* 285, 39401-39408 (2010).
 237. Xia, Y., Cortez-Retamozo, V., Niederkofer, V., Salie, R., Chen, S., Samad, T.A., Hong, C.C., Arber, S., Vyas, J.M., Weissleder, R., Pittet, M.J. & Lin, H.Y. *Dragon (repulsive guidance molecule b) inhibits IL-6 expression in macrophages. J Immunol* 186, 1369-1376 (2011).
 238. Rocher, C., Singla, R., Singal, P.K., Parthasarathy, S. & Singla, D.K. *Bone morphogenetic protein 7 polarizes THP-1 cells into M2 macrophages. Can J Physiol Pharmacol* 90, 947-951 (2012).
 239. Martinez, V.G., Hernandez-Lopez, C., Valencia, J., Hidalgo, L., Entrena, A., Zapata, A.G., Vicente, A., Sacedon, R. & Varas, A. *The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. Immunol Cell Biol* 89, 610-618 (2011).
 240. Martinez, V.G., Hidalgo, L., Valencia, J., Hernandez-Lopez, C., Entrena, A., del Amo, B.G., Zapata, A.G., Vicente, A., Sacedon, R. & Varas, A. *Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells. Eur J Immunol* 44, 1031-1038.
 241. Robson, N.C., Wei, H., McAlpine, T., Kirkpatrick, N., Cebon, J. & Maraskovsky, E. *Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. Blood* 113, 3218-3225 (2009).
 242. Trotta, R., Dal Col, J., Yu, J., Ciarlariello, D., Thomas, B., Zhang, X., Allard, J., 2nd, Wei, M., Mao, H., Byrd, J.C., Perrotti, D. & Caligiuri, M.A. *TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. J Immunol* 181, 3784-3792 (2008).
 243. Allan, D.S., Rybalov, B., Awong, G., Zuniga-Pflucker, J.C., Kopcow, H.D., Carlyle, J.R. & Strominger, J.L. *TGF-beta affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. Eur J Immunol* 40, 2289-2295 (2011).
 244. Meadows, S.K., Eriksson, M., Barber, A. & Sentman, C.L. *Human NK cell IFN-gamma production is regulated by endogenous TGF-beta. Int Immunopharmacol* 6, 1020-1028 (2006).

245. Seeger, P., Bosisio, D., Parolini, S., Badolato, R., Gismondi, A., Santoni, A. & Sozzani, S. *Activin A as a mediator of NK-dendritic cell functional interactions*. *J Immunol* 192, 1241-1248 (2014).
246. Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.C., Lu, D., Campos, L., Goulding, D., Ng, B.L., Dougan, G., Huntly, B., Gottgens, B., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Colucci, F. & Liu, P. *Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion*. *Science* 329, 85-89 (2010).
247. Rothenberg, E.V., Zhang, J. & Li, L. *Multilayered specification of the T-cell lineage fate*. *Immunol Rev* 238, 150-168 (2010).
248. de Yebenes, V.G., Carrasco, Y.R., Ramiro, A.R. & Toribio, M.L. *Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor*. *Blood* 99, 2948-2956 (2002).
249. Yu, P.B., Hong, C.C., Sachidanandan, C., Babbitt, J.L., Deng, D.Y., Hoyng, S.A., Lin, H.Y., Bloch, K.D. & Peterson, R.T. *Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism*. *Nat Chem Biol* 4, 33-41 (2008).
250. Fink, P.J. *The biology of recent thymic emigrants*. *Annu Rev Immunol* 31, 31-50 (2013).
251. Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L. & Cyster, J.G. *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. *Nature* 427, 355-360 (2004).
252. Mayol, K., Biajoux, V., Marvel, J., Balabanian, K. & Walzer, T. *Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking*. *Blood* 118, 4863-4871 (2011).
253. Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y., Baratin, M., Tomasello, E. & Vivier, E. *Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor*. *Nat Immunol* 8, 1337-1344 (2007).
254. Krueger, P.D., Lassen, M.G., Qiao, H. & Hahn, Y.S. *Regulation of NK cell repertoire and function in the liver*. *Crit Rev Immunol* 31, 43-52 (2011).
255. Male, V., Sharkey, A., Masters, L., Kennedy, P.R., Farrell, L.E. & Moffett, A. *The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire*. *Eur J Immunol* 41, 3017-3027.
256. Vacca, P., Moretta, L., Moretta, A. & Mingari, M.C. *Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy*. *Trends Immunol* 32, 517-523 (2011).
257. Karimi, K. & Arck, P.C. *Natural Killer cells: keepers of pregnancy in the turnstile of the environment*. *Brain Behav Immun* 24, 339-347 (2010).
258. Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A., Vitale, M. & Marcenaro, E. *TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When?* *Front Immunol* 5, 105 (2014).
259. Singh, A. & Morris, R.J. *The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 299-313 (2010).
260. Hao, J., Ho, J.N., Lewis, J.A., Karim, K.A., Daniels, R.N., Gentry, P.R., Hopkins, C.R., Lindsley, C.W. & Hong, C.C. *In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors*. *ACS Chem Biol* 5, 245-253 (2010).
261. Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L. & Munz, C. *Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16606-16611 (2004).
262. Garcia-Peydro, M., de Yebenes, V.G. & Toribio, M.L. *Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates*. *J Immunol* 177, 3711-3720 (2006).
263. Poggi, A., Costa, P., Morelli, L., Cantoni, C., Pella, N., Spada, F., Biassoni, R., Nanni, L., Revello, V., Tomasello, E., Mingari, M.C., Moretta, A. & Moretta, L. *Expression of human NKRP1A by CD34+ immature thymocytes: NKRP1A-mediated regulation of proliferation and cytolytic activity*. *Eur J Immunol* 26, 1266-1272 (1996).

264. Cheng, M., Charoudeh, H.N., Brodin, P., Tang, Y., Lakshmikanth, T., Hoglund, P., Jacobsen, S.E. & Sitnicka, E. *Distinct and overlapping patterns of cytokine regulation of thymic and bone marrow-derived NK cell development. J Immunol* 182, 1460-1468 **(2009)**.
265. Pek, E.A., Chan, T., Reid, S. & Ashkar, A.A. *Characterization and IL-15 dependence of NK cells in humanized mice. Immunobiology* 216, 218-224 **(2011)**.
266. Becknell, B. & Caligiuri, M.A. *Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. Adv Immunol* 86, 209-239 **(2005)**.
267. Gwin, K., Dolence, J.J., Shapiro, M.B. & Medina, K.L. *Differential requirement for Hoxa9 in the development and differentiation of B, NK, and DC-lineage cells from Flt3+ multipotential progenitors. BMC Immunol* 14, 5 **(2013)**.
268. Di Santo, J.P. *A defining factor for natural killer cell development. Nat Immunol* 10, 1051-1052 **(2009)**.
269. Huntington, N.D., Nutt, S.L. & Carotta, S. *Regulation of murine natural killer cell commitment. Front Immunol* 4, 14 **(2013)**.
270. Kashiwada, M., Pham, N.L., Pewe, L.L., Harty, J.T. & Rothman, P.B. *NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8alpha(+) dendritic cell development. Blood* 117, 6193-6197 **(2011)**.
271. Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J., Takeda, N., Sakata, J., Mishima, Y., Hitomi, J., Yamamoto, T., Utsuyama, M., Niwa, O., Aizawa, S. & Kominami, R. *Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. Nat Immunol* 4, 533-539 **(2003)**.
272. Ikawa, T., Fujimoto, S., Kawamoto, H., Katsura, Y. & Yokota, Y. *Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5164-5169 **(2001)**.
273. Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S. & Gruss, P. *Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. Nature* 397, 702-706 **(1999)**.
274. Mace, E.M., Hsu, A.P., Monaco-Shawver, L., Makedonas, G., Rosen, J.B., Dropulic, L., Cohen, J.I., Frenkel, E.P., Bagwell, J.C., Sullivan, J.L., Biron, C.A., Spalding, C., Zerbe, C.S., Uzel, G., Holland, S.M. & Orange, J.S. *Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. Blood* 121, 2669-2677 **(2013)**.
275. Loza, M.J., Metelitsa, L.S. & Perussia, B. *NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production. Eur J Immunol* 32, 3453-3462 **(2002)**.
276. Cohen, M.M., Jr. *Perspectives on RUNX genes: an update. Am J Med Genet A* 149A, 2629-2646 **(2009)**.
277. Ohno, S., Sato, T., Kohu, K., Takeda, K., Okumura, K., Satake, M. & Habu, S. *Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN-gamma expression during NK cell differentiation. Int Immunol* 20, 71-79 **(2008)**.
278. Galy, A.H., de Waal Malefyt, R., Barcena, A., Peterson, S.M. & Spits, H. *Untransfected and SV40-transfected fetal and postnatal human thymic stromal cells. Analysis of phenotype, cytokine gene expression and cytokine production. Thymus* 22, 13-33 **(1993)**.
279. Minagawa, M., Watanabe, H., Miyaji, C., Tomiyama, K., Shimura, H., Ito, A., Ito, M., Domen, J., Weissman, I.L. & Kawai, K. *Enforced expression of Bcl-2 restores the number of NK cells, but does not rescue the impaired development of NKT cells or intraepithelial lymphocytes, in IL-2/IL-15 receptor beta-chain-deficient mice. J Immunol* 169, 4153-4160 **(2002)**.
280. Vosshenrich, C.A., Ranson, T., Samson, S.I., Corcuff, E., Colucci, F., Rosmaraki, E.E. & Di Santo, J.P. *Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. J Immunol* 174, 1213-1221 **(2005)**.

281. Peng, H. & Tian, Z. *NK cell trafficking in health and autoimmunity: a comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol* 47, 119-127 **(2014)**.
282. Vianello, F., Kraft, P., Mok, Y.T., Hart, W.K., White, N. & Poznansky, M.C. *A CXCR4-dependent chemorepellent signal contributes to the emigration of mature single-positive CD4 cells from the fetal thymus. J Immunol* 175, 5115-5125 **(2005)**.
283. Bai, A., Hu, H., Yeung, M. & Chen, J. *Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription. J Immunol* 178, 7632-7639 **(2007)**.
284. Chen, S., Kawashima, H., Lowe, J.B., Lanier, L.L. & Fukuda, M. *Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. J Exp Med* 202, 1679-1689 **(2005)**.
285. Staton, T.L., Johnston, B., Butcher, E.C. & Campbell, D.J. *Murine CD8+ recent thymic emigrants are alphaE integrin-positive and CC chemokine ligand 25 responsive. J Immunol* 172, 7282-7288 **(2004)**.
286. Tanaskovic, S., Fernandez, S., Price, P., Lee, S. & French, M.A. *CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+ T-cells or gammadelta T-cells, in HIV patients responding to ART. Immunol Cell Biol* 88, 321-327 **(2010)**.
287. Ito, H., Esashi, E., Akiyama, T., Inoue, J. & Miyajima, A. *IL-18 produced by thymic epithelial cells induces development of dendritic cells with CD11b in the fetal thymus. Int Immunol* 18, 1253-1263 **(2006)**.
288. Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi, S. & Ikuta, K. *Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 1915-1920 **(2014)**.
289. White, A.J., Jenkinson, W.E., Cowan, J.E., Parnell, S.M., Bacon, A., Jones, N.D., Jenkinson, E.J. & Anderson, G. *An essential role for medullary thymic epithelial cells during the intrathymic development of invariant NKT cells. J Immunol* 192, 2659-2666 **(2014)**.
290. Maghazachi, A.A. *Role of chemokines in the biology of natural killer cells. Curr Top Microbiol Immunol* 341, 37-58 **(2010)**.
291. Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E. & Walzer, T. *The trafficking of natural killer cells. Immunol Rev* 220, 169-182 **(2007)**.
292. Moroso, V., Metselaar, H.J., Mancham, S., Tilanus, H.W., Eissens, D., van der Meer, A., van der Laan, L.J., Kuipers, E.J., Joosten, I. & Kwekkeboom, J. *Liver grafts contain a unique subset of natural killer cells that are transferred into the recipient after liver transplantation. Liver Transpl* 16, 895-908.
293. Ishiyama, K., Ohdan, H., Ohira, M., Mitsuta, H., Arihiro, K. & Asahara, T. *Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. Hepatology* 43, 362-372 **(2006)**.
294. Kopcow, H.D., Allan, D.S., Chen, X., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Ge, B. & Strominger, J.L. *Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15563-15568 **(2005)**.
295. Hanna, J. & Mandelboim, O. *When killers become helpers. Trends Immunol* 28, 201-206 **(2007)**.
296. Cerdeira, A.S., Rajakumar, A., Royle, C.M., Lo, A., Husain, Z., Thadhani, R.I., Sukhatme, V.P., Karumanchi, S.A. & Kopcow, H.D. *Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. J Immunol* 190, 3939-3948 **(2013)**.
297. Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechsler, M., Goodsaid, F. & Caligiuri, M.A. *Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15*

- in combination with IL-12: implications for the innate immune response. J Immunol* 162, 4511-4520 **(1999)**.
298. Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.G. & Bryceson, Y.T. *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. Blood* 115, 2167-2176 **(2010)**.
 299. Peritt, D., Robertson, S., Gri, G., Showe, L., Aste-Amezaga, M. & Trinchieri, G. *Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. J Immunol* 161, 5821-5824 **(1998)**.
 300. Lei, Y., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L.T., Bosl, M.R., Hollander, G.A., Hayashi, Y., Malefyt Rde, W., Nitta, T. & Takahama, Y. *Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. J Exp Med* 208, 383-394 **(2011)**.
 301. Cedile, O., Lobner, M., Toft-Hansen, H., Frank, I., Wlodarczyk, A., Irla, M. & Owens, T. *Thymic CCL2 influences induction of T-cell tolerance. J Autoimmun* **(2014)**.
 302. Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Cao, W. & Liu, Y.J. *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. Nature* 436, 1181-1185 **(2005)**.
 303. Martin-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbi, A.L. & Toribio, M.L. *Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. Blood* 115, 5366-5375 **(2010)**.
 304. Eriksson, M., Meadows, S.K., Basu, S., Mselle, T.F., Wira, C.R. & Sentman, C.L. *TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium. J Immunol* 176, 6219-6224 **(2006)**.
 305. Newman, K.C. & Riley, E.M. *Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. Nat Rev Immunol* 7, 279-291 **(2007)**.
 306. Nunes-Alves, C., Nobrega, C., Behar, S.M. & Correia-Neves, M. *Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. Trends Immunol* 34, 502-510 **(2013)**.
 307. Savino, W. *The thymus is a common target organ in infectious diseases. PLoS Pathog* 2, e62 **(2006)**.
 308. Ganesan, S. & Ganesan, K. *Multilocular thymic tuberculosis: case report. Br J Radiol* 81, e127-129 **(2008)**.
 309. Nobrega, C., Cardona, P.J., Roque, S., Pinto do, O.P., Appelberg, R. & Correia-Neves, M. *The thymus as a target for mycobacterial infections. Microbes Infect* 9, 1521-1529 **(2007)**.
 310. Nobrega, C., Roque, S., Nunes-Alves, C., Coelho, A., Medeiros, I., Castro, A.G., Appelberg, R. & Correia-Neves, M. *Dissemination of mycobacteria to the thymus renders newly generated T cells tolerant to the invading pathogen. J Immunol* 184, 351-358.
 311. Esin, S., Counoupas, C., Aulicino, A., Brancatisano, F.L., Maisetta, G., Bottai, D., Di Luca, M., Florio, W., Campa, M. & Batoni, G. *Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. Scand J Immunol* 77, 460-469 **(2013)**.
 312. Marcenaro, E., Ferranti, B., Falco, M., Moretta, L. & Moretta, A. *Human NK cells directly recognize Mycobacterium bovis via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. Int Immunol* 20, 1155-1167 **(2008)**.
 313. Esin, S. & Batoni, G. *Natural Killer Cells: A Coherent Model for Their Functional Role in Mycobacterium tuberculosis Infection. J Innate Immun.*
 314. Nobrega, C., Nunes-Alves, C., Cerqueira-Rodrigues, B., Roque, S., Barreira-Silva, P., Behar, S.M. & Correia-Neves, M. *T cells home to the thymus and control infection. J Immunol* 190, 1646-1658 **(2013)**.
 315. Dorner, B.G., Smith, H.R., French, A.R., Kim, S., Poursine-Laurent, J., Beckman, D.L., Pingel, J.T., Kroczeck, R.A. & Yokoyama, W.M. *Coordinate expression of cytokines and*

- chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. J Immunol* 172, 3119-3131 **(2004)**.
316. Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H. & Lee, J.O. *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. Cell* 130, 1071-1082 **(2007)**.
 317. Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G. & Rodeck, U. *Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. J Immunol* 155, 1066-1073 **(1995)**.
 318. Harizi, H. *Reciprocal crosstalk between dendritic cells and natural killer cells under the effects of PGE2 in immunity and immunopathology. Cell Mol Immunol* 10, 213-221 **(2013)**.
 319. Dao, T., Gomez-Nunez, M., Antczak, C., Kappel, B., Jaggi, J.S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V. & Scheinberg, D.A. *Natural killer cells license dendritic cell cross-presentation of B lymphoma cell-associated antigens. Clin Cancer Res* 11, 8763-8772 **(2005)**.
 320. Tosi, D., Valenti, R., Cova, A., Sovena, G., Huber, V., Pilla, L., Arienti, F., Belardelli, F., Parmiani, G. & Rivoltini, L. *Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8+ T cell responses against human tumor antigens. J Immunol* 172, 5363-5370 **(2004)**.
 321. Robson, N.C., Hidalgo, L., McAlpine, T., Wei, H., Martinez, V.G., Entrena, A., Melen, G.J., MacDonald, A.S., Phythian-Adams, A., Sacedon, R., Maraskovsky, E., Cebon, J., Ramirez, M., Vicente, A. & Varas, A. *Optimal Effector Functions in Human Natural Killer Cells Rely upon Autocrine Bone Morphogenetic Protein Signaling. Cancer Res* 74, 5019-5031 **(2014)**.
 322. Laurila, R., Parkkila, S., Isola, J., Kallioniemi, A. & Alarmo, E.L. *The expression patterns of gremlin 1 and noggin in normal adult and tumor tissues. Int J Clin Exp Pathol* 6, 1400-1408 **(2013)**.
 323. Tarragona, M., Pavlovic, M., Arnal-Estape, A., Urosevic, J., Morales, M., Guiu, M., Planet, E., Gonzalez-Suarez, E. & Gomis, R.R. *Identification of NOG as a specific breast cancer bone metastasis-supporting gene. J Biol Chem* 287, 21346-21355 **(2012)**.
 324. Martínez, C. Tesis Doctoral, Universidad Autonoma de Madrid (2011).

SUMMARY

INTRODUCTION

NK cells are a subset of lymphoid cells that play a fundamental role in defense against intracellular pathogens, tumor surveillance, and the production of cytokines that promote adaptive immune responses ¹. NK cells develop from CD34⁺ hematopoietic precursor cells, and it is generally accepted that bone marrow is the main site of NK cell development in adult humans ^{1,2}. However, several reports have shown that hematopoietic precursors and developing NK cells also can be found in human adult intestine ³, uterus ⁴, liver ⁵, and secondary lymphoid tissues, such as lymph nodes and tonsils ⁶. The thymus also is considered a site of NK cell development because mature NK cells and multipotent as well as bipotent T/NK and NK/dendritic cell (DC) precursors can be isolated from human postnatal thymus, but a complete pathway of NK cell differentiation at this site has not been defined in humans ⁷⁻¹⁰. By contrast, it has been recently demonstrated in mice the existence of a thymic pathway of NK cell development characterized by expression of CD127 and GATA3 ¹¹. Thymic NK cell development also has been reported to rely on the expression of members of the inhibitor of differentiation/DNA binding (Id) protein family, such as Id2 and Id3, and the balance between Nfil3/E4bp4 and Bcl11b transcription factors ¹²⁻¹⁴.

The bone morphogenetic protein (BMP) family, belonging to the TGF β superfamily, includes secreted signaling proteins that bind to a heteromeric receptor complex commonly constituted by the following type I and type II serine-threonine kinase receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6, type IA Activin receptor (ActRIA)/ALK-2, and type II BMP receptor (BMPRII) ¹⁵⁻¹⁷. On BMP binding, type II receptors phosphorylate type I receptors that then activate the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads) by phosphorylation. Subsequently, BR-Smads bind to the common partner Smad4, and the complex translocates into the nucleus where it regulates the transcription of BMP target genes, including Id proteins and Runx transcription factors ^{15,18,19}. Moreover, the existence of numerous antagonists, co-repressors and activators together with intracellular regulators makes to BMP signaling be highly regulated ¹⁵.

BMPs were originally described by their capacity to induce bone and cartilage formation ^{20,21}. However, further studies have revealed a much broader range of biological activities of the different components of the BMP family. It is now known that BMPs regulate the proliferation, differentiation, chemotaxis and apoptosis of different cell types and are involved in many developmental processes, including left–right asymmetry, patterning of the central nervous system and the development of many organs ²². The BMP signaling also seems to

participate in the proliferation and differentiation of human bone marrow haematopoietic stem cells, in synergy with several cytokines^{23,24}. In the immune system, we and others have recently described a role for BMP2 and BMP4 in human and murine thymus²⁵⁻²⁷, where BMP4 inhibits human T-cell differentiation acting on the maturation of thymic CD34⁺ cell progenitors. However, a role of BMP signaling in intrathymic NK cell development has not been defined yet. Moreover, if they participate in the biology of NK cells from peripheral blood is something unknown.

OBJECTIVE

The objective of the present work will be:

- To analyze the role of BMP signaling in the intrathymic NK cell development.
- To define a complete pathway of NK cell differentiation in human thymus.
- To study the phenotypic and functional characteristics of intrathymic NK cells.
- To evaluate the importance of BMP signaling in the biology of human peripheral blood NK cells.

METHODS

Human thymus samples from patients aged 1 month to 5 years undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Montepíncipe and 12 de Octubre hospitals. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. To isolate different subsets, thymocyte suspensions were enriched by using the sheep red blood cell rosetting technique followed by mAb-coupled magnetic bead treatment (Dynabeads; Invitrogen) to deplete T cells, B cells, myeloid cells, and DCs, as described previously²⁸. These cell suspensions were used for flow cytometry analysis and to sort several thymic populations.

NK cells were generated from thymic precursors cultured for different times in chimeric human-mouse FTOCs or in the presence of SCF (100 ng/mL) and IL-15 (1-100 ng/mL). In some experiments BMP-4 (50 ng/mL) or dorsomorphin (5 μ M) also were added to the culture medium.

For activation assays, intrathymic NK cells were cultured for 12 hours in the presence of IL-12 (10ng/ml) and IL-15 (100ng/ml).

PBMCs from buffy coats of healthy donors (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Spain) were prepared by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. NK cells were isolated by negative selection using a NK cell isolation kit from MACS (Miltenyi Biotech, Auburn). NK cells were maintained in culture media supplemented with IL-2 (50ng/ml), IL-12 (10ng/ml) and polyI:C (12,5µg/ml) in the presence of DMSO or DMH1 at different concentrations for 12 hours.

RESULTS AND DISCUSSION

Intrathymic CD34⁺ precursor cells express the factors needed for BMP signal transduction, BR-Smads, and Co-Smad proteins, as well as the type I BMP receptors, BMPRI^B, and mainly BMPRI^A. The treatment of chimeric human-mouse fetal thymus organ cultures with BMP4 inhibits cell expansion, arrests thymocyte differentiation, and leads to the accumulation of human CD34⁺ precursor cells, as well as an increment of CD56⁺CD3⁻ NK cells in these cultures.

The phenotypic analysis showed that BMPRI^A⁺ precursors mostly express the NK cell lineage-related marker CD161, as well as CD215 and CD122, α and β subunits of IL-15R, a key cytokine in NK cell development²⁹⁻³¹. The expression of transcription factors such as NFIL3 and ID3, which are associated with NK cell development^{12,32,33}, is higher in thymic BMPRI^A⁺ precursors. However, BCL11B and HES1, both required for the T-cell lineage^{34,35}, show a lower expression in this subpopulation. In this context, Klein-Wolterink et al have proposed that the relative expression levels of Nfil3 versus Bcl11b would be major determinants of NK versus T-cell fate decision at specific developmental cell stages¹³.

In accordance with their phenotypic characteristics CD34⁺CD1a⁻BMPRI^A⁺ intrathymic precursors mainly generate NK cells when they are cocultured with thymic stromal cells in chimeric human-mouse fetal thymic organ cultures, being these NK cells generated functional cells, since they exhibit cytotoxicity activity and production of IFN γ . Besides, BMPRI^A⁺ thymic progenitors generate NK cells through a BMPRI^A⁺ intermediate stage, in a differentiation assay specific to NK cell production in the presence of SCF and IL-15, and BMP4 is autocrinally produced by developing NK cells from the early steps of the differentiation process. In this way, our results show that the BMP signaling pathway functions at several stages, and that BMP4 and IL-15 cooperate in thymic NK cell differentiation. On the one hand, the IL-15-induced NK cell differentiation involves the up-regulation of BMP signaling. On the other hand, autocrine BMP signaling can promote the differentiation of thymic NK cells by regulating the expression of one of the components of IL-15 receptor, CD122, as well as key transcription factors required for NK cell lineage such as ID2, ID3, NFIL3 or RUNX3. Id proteins and RUNX

transcription factors are important gene targets of BMP pathway in several cell types^{18,19} including human intrathymic CD34⁺ cells. In this way, the resulting population of IL-15-responsive NK cell precursors can be expanded by IL-15, whose action is mediated by BMP signaling during the last steps of thymic NK cell differentiation, being both required for the acquisition of the functional capabilities of mature NK cells.

Recent studies in human lymph nodes and tonsils have defined a complete pathway of NK cell development starting with multipotent precursor cells (stage 1, CD34⁺CD117⁺CD94⁻ pro-NK cells and stage 2, CD34⁺CD117⁺CD94⁻ pre-NK cells) proceeding through NK-committed cells (stage 3, CD34⁻CD117⁺CD94⁻ immature NK cells) into mature NK cells (stage 4, CD34⁻CD117⁺CD94⁺CD56⁺ cells)⁶. According to our results from in vitro NK cell differentiation assays and ex vivo phenotypic analyses, a similar progression of developmental stages may occur during NK cell differentiation in the human thymus. The intrathymic subpopulation of CD34⁺BMPRIA⁺ cells could be equivalent to CD34⁺CD117⁺CD94⁻ pre-NK cells, because they share several phenotypic features such as the expression of CD117, CD161 or even BMPRIA, as well as the ability to respond to IL-15⁶. Besides, both populations mainly differentiate into NK cells, although they can generate low numbers of other cell types. Subsequently, CD34⁺BMPRIA⁺ precursors give rise to BMPRIA⁺ immature NK cells which lose CD34 expression and acquire CD56. These cells express CD117 but not CD94, being comparable with the stage 3 NK cells from lymph nodes. The NCRs⁻KIR⁻CD16⁻CD57⁻ phenotype of this population indicates that they are not recirculating peripheral CD56^{dim} NK cells³⁶⁻³⁹. Finally, following with the progression, the loss of BMPRIA as well as the higher CD56 expression and other activating and inhibitory receptors complete the intrathymic NK cell differentiation, reaching the mature stage of intrathymic NK cells that could be similar to stage 4 from lymph nodes⁶.

The expression of several markers suggests that mature intrathymic NK cells constitute a resident population, mainly located in the medullary region of this organ. This fact indicates that they could have a specific thymic function. In accordance with this hypothesis, the comparative analysis of intrathymic mature NK cells and both subsets of NK cells described in peripheral blood reports specific phenotypic and functional features of intrathymic NK cells. Regarding to function, thymic NK cells express lower levels of granzyme and perforin than peripheral NK cells and in correlation, less cytotoxicity capacity after activation. Some mechanism such as TGFβ, NKG2A or L-Galectin expression could be responsible for the reduced cytolytic activity. However intrathymic NK cells are able to secrete increased chemokine amounts, especially CXCL10, XCL1, CCL2 or CCL5 when they are stimulated. Our preliminary data point to an immunomodulatory role, as it has been described in several

organs⁴⁰⁻⁴³, collaborating with DCs because different subsets of thymic DCs cells would be able to respond to those chemokines produced by NK cells.

Another possibility, considering the expression of several TRLs by intrathymic NK cells, is that this cell subset could play a role in an infection situation. To test this theory we are currently collaborating with Dra. Correia-Neves' lab. Our preliminary results indicate that there is an increase of the percentage of NK cells in the thymus following dissemination of *Mycobacterium avium* or *Mycobacterium tuberculosis*. The specific function of NK cells in these infected models is still unknown, although it could be associated with the chemokine secretion by intrathymic NK cells, given that Correia-Neves et al have reported that the recruitment of peripheral T cells in infected thymus is dependent on CXCR3 expression⁴⁴, which respond to CXCL10, chemokine secreted in high amounts by human intrathymic NK cells after activation.

In addition we have evaluated the role of BMP signaling in the peripheral NK cell biology and our data show that BMP pathway is activated during NK cell stimulation. Most importantly, in sharp contrast to the suppressive effects of the other members of the TGF β superfamily such as TGF- β 1 or activin-A⁴⁵, the inhibition of autocrine BMP signaling in NK cells reveals a novel autocrine activatory pathway that confers optimal functions to NK cells. The blockade of this pathway during the activation of these cells inhibits their IFN γ release as well as the secretion of other cytokines and chemokines. Furthermore, in the absence of autocrine BMP signaling NK cells capacity to proliferate is severely compromised as is their capacity to express phenotypic markers of activation that are known to play important co-activatory roles, their capacity to bi-directionally activate autologous DCs and finally and most importantly, their capacity to kill. The sum of this inhibition could be devastating and life threatening. Collectively, these findings identify a novel BMP specific auto-activatory pathway utilized by NK cells. Most importantly, this pathway may be manipulable for clinical application to enhance NK cell mediated tumor killing and associated.

CONCLUSIONS

1. BMPRIA expression identifies NK cell precursors in the human thymus.
2. BMP signaling positively regulates the intrathymic differentiation of human NK cells and cooperate with IL-15 in several steps of this process.
3. NK cells differentiated in human thymus would stay in the organ like a resident NK cell population with specific phenotypic and functional characteristics, displaying low cytotoxicity activity and high XCL1, CXCL10, CCL2 and CCL5 secretion, after stimulation.

4. BMP signaling confers optimal IFN- γ and global cytokine and chemokine production, phenotypic activation and proliferation, autologous DC activation and cytotoxicity activity to peripheral NK cells.

REFERENCES

1. Caligiuri, M.A. *Human natural killer cells. Blood* 112, 461-469 (2008).
2. Freud, A.G. & Caligiuri, M.A. *Human natural killer cell development. Immunol Rev* 214, 56-72 (2006).
3. Chinen, H., Matsuoka, K., Sato, T., Kamada, N., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kobayashi, T., Hasegawa, H., Sugita, A., Kinjo, F., Fujita, J. & Hibi, T. *Lamina propria c-kit⁺ immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells. Gastroenterology* 133, 559-573 (2007).
4. Vacca, P., Vitale, C., Montaldo, E., Conte, R., Cantoni, C., Fulcheri, E., Darretta, V., Moretta, L. & Mingari, M.C. *CD34⁺ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2402-2407 (2011).
5. Moroso, V., Famili, F., Papazian, N., Cupedo, T., van der Laan, L.J., Kazemier, G., Metselaar, H.J. & Kwekkeboom, J. *NK cells can generate from precursors in the adult human liver. Eur J Immunol* 41, 3340-3350 (2011).
6. Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K. & Caligiuri, M.A. *Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. J Exp Med* 203, 1033-1043 (2006).
7. de Yébenes, V.G., Carrasco, Y.R., Ramiro, A.R. & Toribio, M.L. *Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. Blood* 99, 2948-2956 (2002).
8. Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J.M., Ramiro, A.R., Carrasco, Y.R., Lopez-Botet, M. & Toribio, M.L. *Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. Blood* 91, 2760-2771 (1998).
9. Mingari, M.C., Poggi, A., Biassoni, R., Bellomo, R., Ciccone, E., Pella, N., Morelli, L., Verdiani, S., Moretta, A. & Moretta, L. *In vitro proliferation and cloning of CD3⁻ CD16⁺ cells from human thymocyte precursors. J Exp Med* 174, 21-26 (1991).
10. Sanchez, M.J., Spits, H., Lanier, L.L. & Phillips, J.H. *Human natural killer cell committed thymocytes and their relation to the T cell lineage. J Exp Med* 178, 1857-1866 (1993).
11. Vosshenrich, C.A., Garcia-Ojeda, M.E., Samson-Villeger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., Rogge, L., Ezine, S. & Di Santo, J.P. *A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. Nat Immunol* 7, 1217-1224 (2006).
12. Heemskerk, M.H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A.P., Bakker, A.Q., Weijer, K., Res, P.C. & Spits, H. *Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. J Exp Med* 186, 1597-1602 (1997).
13. Klein Wolterink, R.G., Garcia-Ojeda, M.E., Vosshenrich, C.A., Hendriks, R.W. & Di Santo, J.P. *The intrathymic crossroads of T and NK cell differentiation. Immunol Rev* 238, 126-137 (2010).
14. Schotte, R., Dontje, W., Nagasawa, M., Yasuda, Y., Bakker, A.Q., Spits, H. & Blom, B. *Synergy between IL-15 and Id2 promotes the expansion of human NK progenitor cells, which can be counteracted by the E protein HEB required to drive T cell development. J Immunol* 184, 6670-6679 (2010).
15. Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M. *Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. J Biochem* 147, 35-51 (2010).
16. Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rev* 16, 251-263 (2005).
17. Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. & Knaus, P. *Recent advances in BMP receptor signaling. Cytokine Growth Factor Rev* 20, 343-355 (2009).
18. Miyazono, K. & Miyazawa, K. *Id: a target of BMP signaling. Sci STKE* 2002, pe40 (2002).

19. Cohen, M.M., Jr. *Perspectives on RUNX genes: an update. Am J Med Genet A* 149A, 2629-2646 (2009).
20. Urist, M.R. *Bone: formation by autoinduction. Science* 150, 893-899 (1965).
21. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. & Wang, E.A. *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science* 242, 1528-1534 (1988).
22. Massague, J. & Chen, Y.G. *Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev* 14, 627-644 (2000).
23. Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L. & Dick, J.E. *Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. J Exp Med* 189, 1139-1148 (1999).
24. Detmer, K. & Walker, A.N. *Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. Cytokine* 17, 36-42 (2002).
25. Cejalvo, T., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Diez, B., Gutierrez-Frias, C., Valencia, J., Zapata, A.G., Varas, A. & Vicente, A. *Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. Immunology* 121, 94-104 (2007).
26. Graf, D., Nethisinghe, S., Palmer, D.B., Fisher, A.G. & Merkenschlager, M. *The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. J Exp Med* 196, 163-171 (2002).
27. Hager-Theodorides, A.L., Outram, S.V., Shah, D.K., Sacedon, R., Shrimpton, R.E., Vicente, A., Varas, A. & Crompton, T. *Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. J Immunol* 169, 5496-5504 (2002).
28. Valencia, J., Hernandez-Lopez, C., Martinez, V.G., Hidalgo, L., Zapata, A.G., Vicente, A., Varas, A. & Sacedon, R. *Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34+CD1a- progenitors. J Leukoc Biol* 87, 405-414.
29. Cheng, M., Charoudeh, H.N., Brodin, P., Tang, Y., Lakshmikanth, T., Hoglund, P., Jacobsen, S.E. & Sitnicka, E. *Distinct and overlapping patterns of cytokine regulation of thymic and bone marrow-derived NK cell development. J Immunol* 182, 1460-1468 (2009).
30. Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H. & Di Santo, J.P. *IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. J Exp Med* 206, 25-34 (2009).
31. Pek, E.A., Chan, T., Reid, S. & Ashkar, A.A. *Characterization and IL-15 dependence of NK cells in humanized mice. Immunobiology* 216, 218-224 (2011).
32. Gascoyne, D.M., Long, E., Veiga-Fernandes, H., de Boer, J., Williams, O., Seddon, B., Coles, M., Kioussis, D. & Brady, H.J. *The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. Nat Immunol* 10, 1118-1124 (2009).
33. Kamizono, S., Duncan, G.S., Seidel, M.G., Morimoto, A., Hamada, K., Grosveld, G., Akashi, K., Lind, E.F., Haight, J.P., Ohashi, P.S., Look, A.T. & Mak, T.W. *Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. J Exp Med* 206, 2977-2986 (2009).
34. Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.C., Lu, D., Campos, L., Goulding, D., Ng, B.L., Dougan, G., Huntly, B., Gottgens, B., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Colucci, F. & Liu, P. *Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. Science* 329, 85-89 (2010).
35. Rothenberg, E.V., Zhang, J. & Li, L. *Multilayered specification of the T-cell lineage fate. Immunol Rev* 238, 150-168 (2010).
36. Beziat, V., Descours, B., Parizot, C., Debre, P. & Vieillard, V. *NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. PLoS One* 5, e11966 (2010).
37. Bjorkstrom, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Bjorklund, A.T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M.E., Guzman, C.A., Ljunggren, H.G. & Malmberg, K.J. *Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. Blood* 116, 3853-3864 (2010).
38. Lopez-Verges, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F. & Lanier, L.L. *CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. Blood* 116, 3865-3874 (2010).
39. Yu, J., Mao, H.C., Wei, M., Hughes, T., Zhang, J., Park, I.K., Liu, S., McClory, S., Marcucci, G., Trotta, R. & Caligiuri, M.A. *CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. Blood* 115, 274-281 (2010).

40. Chijioke, O. & Munz, C. *Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation. Front Immunol* 4, 365 **(2013)**.
41. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L. & Vivier, E. *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". Blood* 106, 2252-2258 **(2005)**.
42. Yu, J., Freud, A.G. & Caligiuri, M.A. *Location and cellular stages of natural killer cell development. Trends Immunol* 34, 573-582 **(2013)**.
43. Sharma, R. & Das, A. *Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans. Immunol Res* 58, 125-131 **(2014)**.
44. Nobrega, C., Nunes-Alves, C., Cerqueira-Rodrigues, B., Roque, S., Barreira-Silva, P., Behar, S.M. & Correia-Neves, M. *T cells home to the thymus and control infection. J Immunol* 190, 1646-1658 **(2013)**.
45. Robson, N.C., Wei, H., McAlpine, T., Kirkpatrick, N., Cebon, J. & Maraskovsky, E. *Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. Blood* 113, 3218-3225 **(2009)**.

ANEXO



Cancer Research

Optimal Effector Functions in Human Natural Killer Cells Rely upon Autocrine Bone Morphogenetic Protein Signaling

Neil C. Robson, Laura Hidalgo, Tristan McAlpine, et al.

Cancer Res 2014;74:5019-5031. Published OnlineFirst July 18, 2014.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-13-2845](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2845)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/07/23/0008-5472.CAN-13-2845.DC1.html>

Cited Articles This article cites by 50 articles, 21 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/18/5019.full.html#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Optimal Effector Functions in Human Natural Killer Cells Rely upon Autocrine Bone Morphogenetic Protein Signaling

Neil C. Robson¹, Laura Hidalgo², Tristan McAlpine³, Heng Wei³, Víctor G. Martínez², Ana Entrena², Gustavo J. Melen⁴, Andrew S. MacDonald⁵, Alexander Phythian-Adams⁵, Rosa Sacedón², Eugene Maraskovsky⁶, Jonathan Cebon³, Manuel Ramírez⁴, Angeles Vicente², and Alberto Varas²

Abstract

Natural killer (NK) cells are critical for innate tumor immunity due to their specialized ability to recognize and kill neoplastically transformed cells. However, NK cells require a specific set of cytokine-mediated signals to achieve optimal effector function. Th1-associated cytokines promote effector functions that are inhibited by the prototypic Th2 cytokine IL4 and the TGF β superfamily members TGF β 1 and activin-A. Interestingly, the largest subgroup of the TGF β superfamily are the bone morphogenetic proteins (BMP), but the effects of BMP signaling on NK cell effector functions have not been evaluated. Here, we demonstrate that blood-circulating NK cells express type I and II BMP receptors, BMP-2 and BMP-6 ligands, and phosphorylated isoforms of Smad-1/-5/-8, which mediate BMP family member signaling. In opposition to the inhibitory effects of TGF β 1 or activin-A, autocrine BMP signaling was supportive to NK cell function. Mechanistic investigations in cytokine and TLR-L-activated NK cells revealed that BMP signaling optimized IFN γ and global cytokine and chemokine production, phenotypic activation and proliferation, and autologous dendritic cell activation and target cytotoxicity. Collectively, our findings identify a novel auto-activatory pathway that is essential for optimal NK cell effector function, one that might be therapeutically manipulated to help eradicate tumors. *Cancer Res*; 74(18); 5019–31. ©2014 AACR.

Introduction

Natural killer (NK) cells are circulating innate immune sentinels specialized to recognize and kill tumor and virus-infected cells (1). Consisting typically of 2% to 5% of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), NK cells represent a significant component of the human immune repertoire. Historically, human NK cells have been subdivided into at least two subgroups based on their expression of CD16 and CD56 (2). CD56 intermediate^(int)/CD16⁺ NK cells are credited with more immediate cytotoxic capability, whereas the numerically smaller (in blood) CD56 hi^(hi)/CD16[–] subset is associated with more rapid IFN γ release and proliferation upon activation (3, 4). This early

IFN γ production can act in an autocrine fashion to stimulate NK cells' own effector functions and can also significantly enhance important dendritic cell (DC) functions such as tumor antigen processing, presentation, and cross-presentation for the priming of tumor antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Nevertheless, uncontrolled proliferation and/or release of NK cell inflammatory cytokines can result in pathology or cellular transformation (5, 6). Thus, the immune system has coordinately developed mechanisms to avoid these potentially life-threatening events through the release of inflammatory mediators (7).

With relation to NK cells, their effector functions are best known to be negatively regulated via engagement of inhibitory receptors with MHC class I proteins or by suppressive cytokines such as IL4 or TGF β 1 (8–10). Although it has been known for some time that exogenous TGF β 1 can suppress NK cells IFN γ production, it is only relatively recently that activin-A (a further TGF β superfamily member) has also been described to be inhibitory (11). Considering the TGF β superfamily consists of more than 30 members, our understanding of how members other than TGF β 1 and activin-A may potentially influence NK cells' effector functions is very poor. Interestingly, the largest subset of the TGF β superfamily are the BMPs, yet aside from our recent report demonstrating a role for autocrine BMP signaling in human thymic NK cell development (12), the literature is yet to describe the consequences of BMP signaling to NK cells' effector functions.

The BMPs signal via type I and II serine/threonine kinase receptor heterodimers in complex with the bound ligand. Three type I receptors have been shown to bind BMP ligands, i.e., BMPRIA (or ALK-3), BMPRII (or ALK-6), and the activin

¹Institute of Infection, Immunity and Inflammation, The University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom. ²Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain. ³Ludwig Institute for Cancer Research, Austin Health, Heidelberg, Victoria, Australia. ⁴Department of Oncohematology, Niño Jesús Hospital, Madrid, Spain. ⁵MCCIR, Core Technology Facility, The University of Manchester, Manchester, United Kingdom. ⁶CSL Limited, Parkville, Melbourne, Victoria, Australia.

N.C. Robson, L. Hidalgo, A. Vicente, and A. Varas contributed equally to this article.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Authors: Neil C. Robson, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, Sir Graeme Davis Building, 120 University Place, The University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom. Phone: 44-141-330-2282; Fax: 44-141-330-4297; E-mail: neil.robson@ed.ac.uk; and Alberto Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; E-mail: avaras@bio.ucm.es

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2845

©2014 American Association for Cancer Research.

Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development

Laura Hidalgo,¹ Víctor G. Martínez,¹ Jaris Valencia,¹ Carmen Hernández-López,¹ Miriam N. Vázquez,¹ José R. Nuñez,² Agustín G. Zapata,³ Rosa Sacedón,¹ *Alberto Varas,¹ and *Angeles Vicente¹

¹Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; and ²Transplant Coordination Unit, Hospital Clínico San Carlos, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; and ³Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

The bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway regulates survival, proliferation, and differentiation of several cell types in multiple tissues, including the thymus. Previous reports have shown that BMP signaling negatively regulates T-cell development. Here, we study the subpopulation of early human intrathymic progenitors expressing the type IA BMP receptor (BMPRIA) and provide evidence that CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ precursor cells mostly express surface cell markers and transcription factors typi-

cally associated with NK cell lineage. These CD34⁺ cells mostly differentiate into functional CD56⁺ natural killer (NK) cells when they are cocultured with thymic stromal cells in chimeric human-mouse fetal thymic organ cultures and also in the presence of SCF and IL-15. Moreover, autocrine BMP signaling can promote the differentiation of thymic NK cells by regulating the expression of key transcription factors required for NK cell lineage (eg, Id3 and Nfil3) as well as one of the components of IL-15 recep-

tor, CD122. Subsequently, the resulting population of IL-15-responsive NK cell precursors can be expanded by IL-15, whose action is mediated by BMP signaling during the last steps of thymic NK cell differentiation. Our results strongly suggest that BMPRIA expression identifies human thymic NK cell precursors and that BMP signaling is relevant for NK cell differentiation in the human thymus. (*Blood*. 2012;119(8):1861-1871)

Introduction

Natural killer (NK) cells are CD3[−]CD56⁺ large granular lymphocytes that function within the innate immune system to provide protection against infection and cancer, and they also can produce cytokines and chemokines to influence the adaptive immune response.¹ NK cells develop from CD34⁺ hematopoietic precursor cells, and it is generally accepted that bone marrow is the main site of NK cell development in adult humans.^{1,2} However, several reports have shown that hematopoietic precursors and developing NK cells also can be found in human adult intestine,³ uterus,^{4,5} liver,⁶ and secondary lymphoid tissues, such as lymph nodes and tonsils.⁷ The thymus also is considered a site of NK cell development because mature NK cells and multipotent as well as bipotent T/NK and NK/dendritic cell (DC) precursors can be isolated from human postnatal thymus, but a complete pathway of NK cell differentiation at this site has not been defined in humans.^{8–11} By contrast, it has been recently demonstrated in mice the existence of a thymic pathway of NK cell development characterized by expression of CD127 and GATA-3.¹² Thymic NK cell development also has been reported to rely on the expression of members of the inhibitor of differentiation/DNA binding (Id) protein family, such as Id2 and Id3, the down-regulation of Notch signaling and the balance between Nfil3/E4bp4 and Bcl11b transcription factors.^{13–16}

The bone morphogenetic protein (BMP) family includes secreted signaling proteins that bind to a heteromeric receptor complex commonly constituted by the following type I and type II serine-threonine kinase receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/

ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRII)/ALK-6, type I Activin receptor (ActRIA)/ALK-2, and type II BMP receptor (BMPRII).^{17–19} On BMP binding, type II receptors phosphorylate type I receptors that then activate the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads) by phosphorylation. Subsequently, BR-Smads bind to the common partner Smad4, and the complex translocates into the nucleus where it regulates the transcription of BMP target genes, including Id proteins and Runx transcription factors.^{18,20,21}

It is now known that BMPs are involved in the development of virtually all organs and the maintenance and renewal of several adult tissues, such as the hematopoietic and lymphoid tissues.^{22–26} In the thymus, both cortical and medullary epithelial cells express BMP receptors and produce BMP2 and BMP4 ligands.^{27–29} Thymocyte precursors also produce BMP4 and express the type I and type II BMP receptors as well as the BR-Smads required to initiate the intracellular signaling.^{27,28,30} The stimulation of BMP signaling pathway by treatment with BMP4 of fetal thymic organ cultures (FTOCs) enhances cell survival; inhibits thymocyte expansion; and, importantly, prevents differentiation along the T-cell lineage.^{27–31} On the contrary, the neutralization of the action of endogenously produced BMPs by treatment with different BMP inhibitors enhances thymocyte proliferation and promotes the differentiation of CD4⁺CD8⁺ thymocytes, suggesting that BMP signaling acts as a negative regulator of T-cell development.^{26,28,31}

Here, we show that the subpopulation of early human intrathymic CD34⁺CD1a[−] progenitor cells expressing BMPRIA contains a

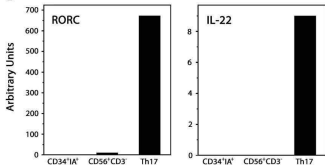
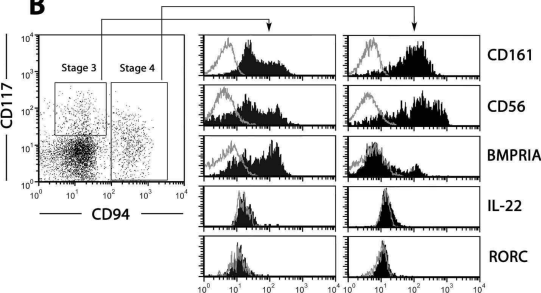
Submitted July 29, 2011; accepted December 16, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 30, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-07-370650.

The online version of the article contains a data supplement.

*A. Varas and A. Vicente contributed equally to this work.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

A**B**

Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells

Alberto Varas,^{1,†,*} Rosa Sacedón,^{1,†} Laura Hidalgo,¹ Víctor G. Martínez,¹ Jaris Valencia,¹ Teresa Cejalvo,² Agustín Zapata,² Carmen Hernández-López¹ and Angeles Vicente¹

Department of Cell Biology; Faculties of ¹Medicine and ²Biology; Complutense University; Madrid, Spain

[†]These authors contributed equally to this work.

Key words: human thymus, CD34⁺ cells, bone morphogenetic proteins, Hedgehog proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs) play a pivotal role during vertebrate embryogenesis and organogenesis, and have also been described to function in regulating cell fate and determination in self-renewing tissues in adults. Recent results have demonstrated that the different components of the BMP2/4 signaling pathway are expressed in the human thymus. In this study, we provide evidence that BMP4 and IL-7 interplay is important in the maintenance of the human thymic progenitor population. Intrathymic CD34⁺ cells express BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA, BMPRII), signal transduction molecules (Smad1, 5, 8 and 4), and produce BMP4. Neutralization of endogenous BMP4 by treatment with the antagonist Noggin reduces thymic precursor cell survival, and the addition of exogenous BMP4 decreases their proliferation. The treatment of chimeric human-mouse fetal thymus organ cultures with BMP4 inhibits cell expansion, arrests thymocyte differentiation, and leads to the accumulation of human CD34⁺ precursor cells. This effect is mainly attributed to the ability of BMP4 to counteract the IL-7-induced proliferation and differentiation of CD34⁺ cells. BMP4 downregulates in the precursor cell population the expression of CD127 and inhibits the IL-7-dependent STAT5 phosphorylation. In addition, BMP signaling is promoted by IL-7. Our results also demonstrate that in thymic progenitors BMPs act downstream of Sonic Hedgehog, previously described to function as a maintenance factor for human intrathymic CD34⁺ precursor cells.

Do not distribute.

Introduction

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted growth factors, which form a subgroup of the TGF β superfamily.¹ More than 20 BMP family members have already been described. They have been classified into several subgroups according to their structural similarities, and also include BMP-like molecules from various species, including dpp protein from *Drosophila melanogaster*.^{2,3} BMPs are dimeric proteins which, upon dimerization, are secreted and proteolytically cleaved. Once secreted, the BMP dimers initiate signaling by binding to a heterotetrameric complex constituted by transmembrane receptors, termed type I and type II, exhibiting serine/threonine kinase activity. The type II receptors are constitutively active kinases, which transphosphorylate type I receptors upon ligand binding. The type I receptors activate intracellular substrates by phosphorylation, and thus determine the specificity of intracellular signals. The main BMP receptors are constituted by the combination of type II BMP receptor (BMPRII) and the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6, and type IA Activin receptor (ActRIA)/ALK-2.³⁻⁷ BMP signal transduction to the nucleus is mediated by Smad protein family. Specifically, Smad1, Smad5 and Smad8 (also called BMP receptor-regulated Smads or BR-Smads) are

phosphorylated and activated by type I BMP receptors. Once phosphorylated, BR-Smads bind to Smad-4 forming a heteromeric complex that translocates into the nucleus where it regulates gene expression using different mechanisms.⁶⁻⁸

The Hedgehog (Hh) protein family is a group of secreted intercellular signaling molecules which, in mammals, is composed by three proteins: Sonic (Shh), Indian (Ihh) and Desert Hh (Dhh), and Shh is the best studied.^{9,10} Hh proteins undergo extensive post-translational modifications before being secreted.^{11,12} Upon secretion, all Hh proteins share a common signaling pathway where Patched (Ptc) and Smoothened (Smo) constitute the surface receptor complex. Ptc is the ligand binder, and Smo transduces the signal into the cell. In the absence of ligand, Ptc exerts an inhibitory effect on Smo activity that is abrogated after Hh binding.^{9,13,14} The intracellular signaling cascade initiated by Smo culminates in the activation of members of the Gli family of zinc finger transcription factors, Gli1, Gli2 and Gli3, which regulate the transcription of different target genes.¹⁵

Although BMP and Hh signaling pathways are known to play critical roles in vertebrate and invertebrate embryogenesis, determining cell fate and patterning during the development of many organs,^{10,16-20} several studies have demonstrated that BMPs and Hh proteins also function in cell fate determination of self-renewing tissues in the adult, such as the hematopoietic

*Correspondence to: Alberto Varas; Email: avaras@bio.ucm.es

Submitted: 08/17/09; Revised: 09/18/09; Accepted: 09/21/09

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cc/article/10149

Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells

Víctor G. Martínez¹, Laura Hidalgo¹, Jaris Valencia¹,
Carmen Hernández-López¹, Ana Entrena¹, Beatriz G. del Amo¹,
Agustín G. Zapata², Angeles Vicente¹, Rosa Sacedón^{*1} and Alberto Varas^{*1}

¹ Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

² Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are multifunctional growth factors regulating differentiation and proliferation in numerous systems including the immune system. Previously, we described that the BMP signaling pathway is functional in human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs), which were found to express both the specific receptors and the Smad proteins required for signal transduction. In this study, we provide evidence that human MoDCs produce BMP-4 and that this production is increased over the maturation process as is BMP signal transduction. When DCs are matured in the presence of an inhibitor of the BMP pathway, the expression of the maturation markers PD-L1 and PD-L2 is reduced, while cytokine production is not affected. As a result, these mature DCs present an augmented ability to stimulate both T cells and NK cells. Eventually, the inhibition of BMP signaling during maturation causes a reduced expression of IRF-1, a transcription factor that positively regulates the expression of PD-L1 and PD-L2. The present study indicates that the BMP signaling pathway regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human MoDCs during the maturation process, probably through the IRF-1 transcription factor, and also points out that the manipulation of BMP signaling might considerably improve the immunogenicity of MoDCs used in immunotherapy.

Keywords: Bone morphogenetic proteins · Dendritic cells · Dorsomorphin · PD-L1 · PD-L2



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the TGF- β superfamily [1]. The BMP signaling pathway is initiated when dimeric ligands associate with type I and type II BMP receptors, which are transmembrane serine/threonine kinases, forming a multimeric receptor-ligand complex. Within this complex,

type I BMP receptors are phosphorylated by ligand-bound type II BMP receptors and then phosphorylate and activate some components of the Smad protein family, Smad1, 5 and 8, called BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads) [1, 2]. Subsequently, BR-Smads form complexes with the common partner Smad4 and translocate into the nucleus, where they regulate the transcription of BMP target genes, including Id proteins and Runx

Correspondence: Dr. Alberto Varas
e-mail: avaras@bio.ucm.es

^{*}These authors contributed equally to this work.



Wnt5a signaling increases IL-12 secretion by human dendritic cells and enhances IFN- γ production by CD4⁺ T cells

Jaris Valencia, Víctor G. Martínez, Laura Hidalgo, Carmen Hernández-López, Noelia M. Canseco, Ángeles Vicente, Alberto Varas¹, Rosa Sacedón^{*,1}

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2014

Received in revised form 23 July 2014

Accepted 8 August 2014

Available online 6 September 2014

Keywords:

Wnt
DCs
T-cell
IL-12
IL-10
IFN- γ

ABSTRACT

Wnt5a is a secreted pleiotropic glycoprotein produced in an inflammatory state by a wide spectrum of ubiquitous cell populations. Recently, we demonstrated that Wnt5a skews the differentiation of human monocyte derived dendritic cells (moDCs) to a tolerogenic functional state. In this study we focus our interest on the role of this Wnt ligand after DC differentiation, during their maturation and function. We show that the expression of Wnt receptors is tightly regulated during the life cycle of DCs suggesting a differential responsiveness to Wnt signaling conditioned by their differentiation stage and the maturational stimuli. Furthermore, we confirm that Wnt5a is the main non-canonical Wnt protein expressed by DCs and its production increases upon specific stimuli. Exogenous Wnt5a improved the endocytic capacity of immature DCs but it is not a stimulatory signal on its own, slightly affecting the maturation and function of DCs. However, knocking down Wnt5a gene expression in maturing DCs demonstrates that DC-derived Wnt5a is necessary for normal IL-12 secretion and plays a positive role during the development of Th1 responses. Wnt5a acts both in autocrine and paracrine ways. Thus, human naive CD4⁺ T cells express Wnt receptors and, the addition of Wnt5a during CD3/CD28 stimulation enhances IL-2 and IFN- γ production. Taken together these results suggest a time-dependent role for Wnt5a during inflammatory responses conditioned by the differentiation stage of cellular targets.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The control of immune system is a delicate and intricate mission that requires the integration of the environmental, tissular and systemic signals. The goal of this mission is not merely to determine the decision between tolerance or immunogenicity but also the type, strength and duration of the specific response. In this scenario dendritic cells (DCs) are high performers. They are able to amalgamate pathogen and damage signals with specific tissular conditions and redirect them to lymphocytes. They are key regulators of the differentiation of effector T cells, directing the immune system toward

tolerance or immunity, adapting decisions to the distinctive features of each pathogen and organ [1,2]. This functional versatility is achieved by the heterogeneity of DC populations that present specific characteristics depending on their anatomical distribution and differing between stationary or inflammatory conditions.

DC populations share the capacity to capture, process and present antigens to T cells but express a myriad of diverse receptors that direct them to different functional phenotypes. Along their life cycle, DCs exist in two general functional states, immature (iDCs) and mature (maDCs). DCs are short lived and constantly replaced by the differentiation of tissue resident or blood-born precursors. There are two bone marrow DC progenitors, common DC precursors and monocytes, which colonize the organs where they complete their last steps of differentiation to iDCs under the influence of particular environmental cues [3]. iDCs are able to present antigens but do not express co-stimulatory molecules nor do they secrete pro-inflammatory cytokines, which are necessary for DC immunogenic function. Consequently, iDCs are functionally tolerogenic. The transition to the mature state is triggered by signals derived from tissue damage or invading pathogens. During maturation, DCs change their transcription profile and migrate to T cell areas in peripheral lymphoid organs, acquiring the capacity to prime T cells and

Abbreviations: DC, dendritic cell; Fzd, frizzled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; iDC, immature DC; LN, lymph node; maDC, mature DC; MFI, mean fluorescence intensity; MLR, mixed leukocyte reaction; moDCs, monocyte-derived DCs; pDCs, plasmacytoid DCs; PI, propidium iodide; qPCR, quantitative PCR; SD, standard deviation; siRNA, small interference RNA; Wnt, wingless-type MMTV integration site.

* Corresponding author at: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941401; fax: +34 91 3941396.

E-mail address: rmsacedo@ucm.es (R. Sacedón).

¹ These authors contributed equally to this work.

Wnt5a Skews Dendritic Cell Differentiation to an Unconventional Phenotype with Tolerogenic Features

Jaris Valencia,* Carmen Hernández-López,* Víctor G. Martínez,* Laura Hidalgo,* Agustín G. Zapata,[†] Ángeles Vicente,* Alberto Varas,*¹ and Rosa Sacedón*¹

Dendritic cells (DCs) are critical regulators of immune responses that integrate signals from the innate and adaptive immune system and orchestrate T cell responses toward either immunity or tolerance. Growing evidence points to the Wnt signaling pathway as a pivotal piece in the immune balance and focuses on DCs as a direct target for their immunoregulatory role. Our results show that the increase in Wnt5a signaling during the differentiation of human DCs from monocytes alters their phenotype and compromises their subsequent capacity to mature in response to TLR-dependent stimuli. These Wnt5a-DCs produce scant amounts of IL-12p70 and TNF- α but increased levels of IL-10. Consequently, these Wnt5a-DCs have a reduced capacity to induce Th1 responses that promote IL-10 secretion by CD4 T cells. Changes in the transcriptional profile of Wnt5a-DCs correlate with their unconventional phenotype caused presumably by increased IL-6/IL-10 signaling during the process of DC differentiation. The effect of Wnt5a is not a consequence of β -catenin accumulation but is dependent on noncanonical Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II/NF- κB signaling. Our results therefore suggest that under high levels of Wnt5a, typical of the inflammatory state and sepsis, monocytes could differentiate into unconventional DCs with tolerogenic features. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 000–000.

Dendritic cells (DCs) play a central role orchestrating adaptive immune responses against pathogens or cancer while maintaining tolerance to self Ags and innocuous micro-organisms or molecules. These dual-antagonistic functions are balanced by a microenvironment that affects developing DCs or signals received during DC activation. This milieu determines DC functional diversity and allows the organization of discrete DC subpopulations into different anatomical compartments, which present specific immunological requirements, and adaptation of their activities to the organism's state (1–3). Recent growing evidence points to Wnt proteins and Wnt signaling components as important modulators of the immune system that participate in the balance between tolerance and immunity and reveal DCs as one of their direct targets (4–6).

Wnt proteins are a large family of secreted proteins widely expressed during development when they are implicated in an

enormous array of processes (7). In adults, Wnt proteins regulate stem cell renewal and differentiation and modulate bone remodeling (8), adipose (9), and tissue homeostasis and hematopoiesis (10), and Wnt signaling deregulation is associated with cancer (11). Wnt proteins also have been proposed as endocrine factors involved in aging (12, 13) and septicemia (14).

To trigger a cellular response, a single Wnt ligand can simultaneously activate distinct signaling pathways (15, 16). Ultimate Wnt signaling output and biological consequences depend on both the Wnt ligand and the receptor context. Canonical signaling is initiated through a multimeric cluster of low-density receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) and Frizzled (Fzd) receptors that recruit the cytoplasmic proteins dishevelled, axin, and glycogen synthase kinase 3 (GSK3) to the membrane. This results in LRP phosphorylation and disassembly of the β -catenin destruction complex, thus preventing constitutive phosphorylation of β -catenin by GSK3 and its subsequent proteolytic destruction. Ultimately, β -catenin accumulates in the nucleus and activates the transcription of Wnt target genes. In parallel to β -catenin transcriptional activity, canonical signaling also may influence a wider range of metabolic and signaling pathways through its inhibitory effect on GSK3 activity (17). Noncanonical signaling occurs independently of β -catenin stabilization. Fzd-activated dishevelled can associate with small GTPases, including Rac, Cdc42, and Rho. They in turn activate ROCK kinase and JNK, which remodel the cytoskeleton and promote c-Jun-regulated cell expression. Fzd–LRP receptor complexes also can signal via G proteins, which induce Ca^{2+} flux that activates calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), protein kinase C (PKC), and subsequently NF-AT. CaMKII can lead to the activation of a nemo-like kinase, which may interfere with β -catenin transcriptional activity (15, 16). Different components of the Wnt pathway have immunomodulatory properties and are possible targets for therapeutic intervention. GSK3 inhibition has a global anti-inflammatory effect and negatively affects innate and adaptive immune responses (18, 19). Endothelial cell-derived Wnt proteins activate the β -catenin-dependent pathway necessary for optimal effector T cell transmigration (20), while inflammation makes macrophages sensitive

*Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; and [†]Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

¹A.V. and R.S. contributed equally to this work.

Received for publication May 2, 2011. Accepted for publication August 5, 2011.

This work was supported by Grants BFU2009-10315 and BFU2010-18250 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, RD06/0010/0003 from Carlos III Health Institute, and GR35/10A-910552 from Complutense University and Autonomous Community of Madrid.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Rosa Sacedón, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: rosasacedon@med.ucm.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CaMKII, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II; CBA, Cytometric Bead Array; DC, dendritic cell; Fzd, Frizzled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; ID, inhibitor of DNA binding; iDC, immature dendritic cell; IRF, IFN regulatory factor; LRP, low-density receptor-related protein; MFI, mean fluorescence intensity; PDL, programmed cell death ligand; PKC, protein kinase C; poly I:C, polyinosinic-polycytidylic acid; SOCS, suppressors of cytokine signaling.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

ORIGINAL ARTICLE

The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation

Víctor G Martínez¹, Carmen Hernández-López¹, Jaris Valencia¹, Laura Hidalgo¹, Ana Entrena¹, Agustín G Zapata², Angeles Vicente¹, Rosa Sacedón^{1,3} and Alberto Varas^{1,3}

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the transforming growth factor- β superfamily, are multifunctional polypeptides regulating a broad spectrum of functions in embryonic and adult tissues. Recent reports have demonstrated that BMPs regulate the survival, proliferation and differentiation of several cell types in the immune system. In this study, we investigate the effects of BMP signaling activation on the capacity of human dendritic cells (DCs) to stimulate immune responses. Human DCs express type I and type II BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, type IA activin receptor, BMPRII) and BMP signal transduction molecules (Smad1, 5, and 8, as well as Smad4). On BMP stimulation, Id1–3 (inhibitor of differentiation 1–3/DNA binding) mRNA expression is upregulated and this effect can be blocked with the inhibitor dorsomorphin, showing that the canonical BMP signal transduction pathway is functionally active in DCs. BMP signaling activation promotes the phenotypic maturation of human DCs by increasing the expression of co-stimulatory molecules and also CD83, programmed cell death ligand 1 (PD-L1) and PD-L2, and stimulates cytokine secretion, mainly interleukin-8 and tumor necrosis factor- α . Accordingly, BMP-treated DCs exhibit an enhanced T-cell stimulatory capacity. BMP signaling also enhances the survival of human DCs increasing the Bcl-2/Bax ratio. Finally, the expression of Runx transcription factors is increased in mature DCs, and the mRNA levels of Runx1–3 are upregulated in response to BMP stimulation, indicating that Runx transcription factor family may mediate the effects of BMP signaling in human DC maturation.

Immunology and Cell Biology (2011) 89, 610–618; doi:10.1038/icb.2010.135; published online 23 November 2010

Keywords: bone morphogenetic proteins; dendritic cells; dorsomorphin; Id proteins; Runx proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs) constitute a large subgroup of secreted signaling proteins that belong to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily.¹ BMPs are synthesized as large precursor molecules, which are proteolytically cleaved to release the mature proteins. The active forms usually consist of homodimers that can initiate signaling by binding to heteromeric complexes constituted by transmembrane receptors, termed type I and type II, exhibiting serine/threonine kinase activity. The type II BMP receptor (BMPRII) combined with one of the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6 and type IA activin receptor (ActRIA)/ALK-2, are the most common components of BMP receptors. The constitutively active type II receptors phosphorylate type I receptors on ligand binding, and the activated type I receptors subsequently phosphorylate downstream targets of at least two signaling cascades.^{1–3} The canonical BMP signaling pathway involves the Smad protein family. Specifically, the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads), Smad1, Smad5 and Smad8, are phosphorylated and activated by type I BMP receptors. Once phosphorylated, BR-Smads dissociate from the receptors, form complexes with Smad4, translocate into the nucleus, bind to BMP

responsive elements and function as transcriptional co-modulators to induce or repress BMP target gene expression.^{1,2} The members of the Id (inhibitor of differentiation/DNA binding) protein family, a class of helix–loop–helix proteins, have been shown to be important targets for BMP signaling.^{1,4} In addition to the canonical Smad-dependent signaling pathway, the activated receptor complexes may initiate a non-canonical Smad-independent pathway leading to activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).^{1,3}

BMPs were originally identified as growth and differentiation factors for osteogenic cells,⁵ and are now considered as multifunctional polypeptides.⁶ BMPs have key roles in the development of many organs and also function in adult tissues.^{1,3,7,8} In the immune system, BMP6 inhibits the proliferation of human B cell progenitors as well as mature B cells through the Smad-dependent pathway.^{9,10} Likewise, different members of BMP family have been demonstrated to have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in multiple myeloma cells.^{11,12} We and others have shown that BMP2, BMP4 and BMP7 are the main ligands expressed in the human and murine thymus.^{13–15} BMP4 enhances the survival of thymocyte precursors and inhibits their proliferation.^{15,16} Also, BMP4 arrests early T-cell

¹Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain and ²Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain
³These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr A Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid 28040, Spain.

E-mail: avaras@bio.ucm.es

Received 25 May 2010; revised 8 October 2010; accepted 14 October 2010; published online 23 November 2010

The CXCL12/CXCR4 Pair in Aged Human Thymus

Carmen Hernández-López^a Alberto Varas^b Rosa Sacedón^b Víctor G. Martínez^b
Laura Hidalgo^b Jaris Valencia^b Agustín G. Zapata^c Ángeles Vicente^b

^aCenter for Cytometry and Microscopy, ^bDepartment of Cell Biology, School of Medicine, and ^cFaculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Key Words

Chemokines · CXCL12/CXCR4 · Human thymus · Aging · T cell maturation

Abstract

CXCL12 is an important CXC chemokine involved in numerous biological processes. We had previously demonstrated the synergistic participation of CXCL12 and IL-7 in the control of both survival and proliferation of CD34⁺ human thymic lymphoid progenitors. On this basis, we hypothesize a presumptive role for CXCL12 and its receptor, CXCR4, in the thymus involution. In this respect, in the current report we describe the expression of both molecules in the human thymus during aging. Our results demonstrate that, despite the profound alterations observed in the thymic epithelial microenvironment of aged thymuses, the proportions of different CD4/CD8 thymocyte subsets do not undergo significant variations. Remarkably, a strong CXCL12 expression was found in older thymuses, which appeared in the same locations as in younger thymuses: the subcapsular and medullary areas. The proportions of CXCR4⁺ cells, most of them belonging to the CD3⁺ compartment, showed no important variations in the older thymuses. However, within the CD34⁺ cell population, a significant reduction in the expression of CXCR4 molecules was observed.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Chemokines are small, soluble proteins (about 10 kDa) capable to produce a chemotactic cellular response. The chemokine family, which approximately comprises 50 members and 25 receptors, has been divided into four groups based on the position of the four conserved cysteine residues in the N-terminal region. With a few exceptions, CC chemokines bind to CC receptors, whereas CXC chemokines activate CXC receptors. Chemokine receptors belong to the family of G-protein-coupled receptors that activate adenylate-cyclase, phospholipases, GTPases (Rho, Rac, Cdc42) and major kinases (MAPK, PI3K) [1].

CXCL12 is an important member of the CXC subfamily that was firstly isolated from a murine bone marrow stroma cell line and has pleiotropic effects on the lympho-hematopoietic system as well as on the nervous system. CXCL12 was initially reported as a highly effective chemoattractant for lymphocytes and monocytes but not for neutrophils. Later it was recognized for regulating mature T and B lymphocyte survival and the generation of memory T cells [2]. In addition, CXCL12 and its receptor CXCR4 are key factors to regulate homing/mobilization of hematopoietic stem cells between bone marrow and peripheral blood, a process that undergoes catecholamine-mediated circadian variations [3]. On the

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
1021-7401/10/0173-0217\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/nim

Carmen Hernández-López
Center for Cytometry and Microscopy
Complutense University of Madrid
ES-28040 Madrid (Spain)
Tel. +34 913 944 938, Fax +34 913 944 191, E-Mail carmenh@bio.ucm.es

Transient β -catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34⁺CD1a⁻ progenitors

Jaris Valencia,* Carmen Hernández-López,* Víctor G. Martínez,* Laura Hidalgo,* Agustín G. Zapata,[†] Ángeles Vicente,* Alberto Varas,*¹ and Rosa Sacedón*^{1,2}

Department of Cell Biology, Faculties of *Medicine and [†]Biology, Complutense University, Madrid, Spain

RECEIVED MAY 22, 2009; REVISED OCTOBER 8, 2009; ACCEPTED OCTOBER 28, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0509344

ABSTRACT

Increasing evidence includes Wnt proteins inside the group of master-signaling pathways that govern immune and nonimmune differentiation systems, fundamental for normal development and homeostasis. Although their precise functions in bone marrow and thymus are still controversial, numerous studies have shown that Wnt signaling is able to control the proliferation of hematopoietic stem cells and thymic progenitors and might also affect their cell-fate decisions and subsequent maturation. In the present work, we analyze the effect of transient stimulation of the canonical Wnt pathway in the differentiation potential of Lin⁻CD34⁺CD1a⁻ human thymic progenitors, a multipotent and heterogeneous cell population that has the capacity to develop into T cells, NK cells, monocytes, cDC, and pDC. Our results demonstrate that giving a boost to canonical Wnt signaling, triggered by transient exposure to Wnt3a or LiCl, the differentiation capacity of thymic progenitors changes, enhancing NK cell production. On the contrary, Wnt3a- or LiCl-pretreated thymic progenitors generate a significantly lower number of myeloid lineage cells, monocytes, and cDC and exhibit a reduced capacity to differentiate into pDC lineage. As a possible mechanism for this effect, we show that Wnt3a- and LiCl-pretreated progenitors change their membrane levels of receptors for cytokines pivotal for their expansion and differentiation, such as Flt3L. Moreover, canonical Wnt pathway stimulation modifies the transcription factor profile of CD34⁺CD1⁻ thymocytes, increasing Hes-1 and ID3 expression levels. *J. Leukoc. Biol.* 87: 405–414; 2010.

Abbreviations: cDC=conventional dendritic cell(s), Dkk1=Dickkopf homolog 1 (*Xenopus laevis*), DN=double-negative, DP=double-positive, Flt3L=fetal liver tyrosine kinase 3 ligand, FTOC=fetal thymic organ culture(s), Fzd=Frizzled, GNB2L1=guanine nucleotide-binding protein (G protein), β -polypeptide 2-like 1, GSK-3 β =glycogen synthase kinase-3 β , Hes-1=homeobox gene in embryonic stem cell 1, HSC=hematopoietic stem cell(s), ID2/3=inhibitor of DNA binding 2/3, LEF=lymphoid enhancer factor, LiCl=lithium chloride, LPR=lipoprotein-related protein, pDC=plasmacytoid dendritic cell(s), PI=propidium iodide, SCF=stem cell factor, TCF=T cell factor

Introduction

As reported for other families of morphogens described in the thymus [1], besides being key in the bone marrow, Wnt proteins direct fundamental events during development and tissue renewal, proving the existence of common, basic rules that govern differentiation systems in the embryo and adult organism [2–5]. Wnt signaling pathway is part of the intricate signaling network involved in directing expansion and differentiation of cell progenitors in the thymus [6].

Wnt proteins bind to Fzd receptors that interact with a coreceptor, LPR5 or LPR6 [3]. The Wnt-Fzd-LPR multiprotein complex initiates three possible downstream signaling pathways that can exhibit antagonistic interactions: the canonical Wnt/ β -catenin pathway and two noncanonical Wnt pathways such as Wnt/ Ca^{2+} and RhoA/c-JNK signaling cascades. Wnt signaling output depends on the initial Wnt receptor complex formed, intermediate signaling components, and target cell [7]. The canonical Wnt pathway leads to activation of Dishevelled-1 proteins, which withhold the GSK-3 β activity. In the absence of GSK-3 β activity, β -catenin is not phosphorylated, and therefore, its ubiquitination and subsequent proteasome degradation are impeded. As β -catenin is synthesized continuously, stabilized β -catenin accumulates in the cytosol and translocates to the nucleus, where it interacts with and coactivates members of the LEF/TCF transcription factor family, leading to the activation of target gene expression [5]. Indeed, these transcription factors act as repressors until they are turned on by β -catenin.

Different experimental approaches have been attempted to elucidate the role of canonical Wnt signaling during T cell differentiation. However, results obtained after deletion of β -catenin and/or γ -catenin in HSC, showing that there are no alterations in thymic populations [8–10], are in conflict with the profound changes observed in hematopoiesis and T cell development after constitutive β -catenin stabilization in HSC [8–12] or CD4⁺CD8⁻ DN thymocytes [13, 14]. The analysis of TCF-1 and Lef-1 knock-

1. These authors contributed equally to this work.

2. Correspondence: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail: rosasacedon@med.ucm.es



CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio

Carmen Hernández-López^a, Jaris Valencia^a, Laura Hidalgo^a, Víctor G. Martínez^a, Agustín G. Zapata^b, Rosa Sacedón^a, Alberto Varas^a, Angeles Vicente^{a,*}

^a Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2008

Received in revised form 30 June 2008

Accepted 7 July 2008

Available online 8 August 2008

Keywords:

Human thymus

Thymic dendritic cells

CXCL12

Survival

ABSTRACT

CXCL12, a member of the chemokine CXC subfamily, and its physiologic receptor CXCR4 are essential for the development of various organs during embryonic development and are also involved in the control of cell survival, proliferation and migration in adult tissues. In the human thymus, CXCL12 is produced by epithelial cells located in the subcapsular and medullary regions and CXCR4 is expressed in different thymocyte subpopulations. Several results have demonstrated that CXCL12/CXCR4 signaling participates in different intrathymic processes including the control of human precursor cell survival and proliferation, and the exit of mature thymocytes to the periphery. In this study, we show that CXCL12 is also produced by human thymic dendritic cells (DCs), most of which express CXCR4 receptor. The addition of exogenous CXCL12 significantly inhibited the serum depletion-induced apoptosis in thymic DCs, and the treatment with neutralizing antibodies against CXCL12 or CXCR4 decreased their survival. The survival-promoting effect of CXCL12 was mediated by the up-regulation of Bcl-2 protein expression and the concomitant down-regulation of Bax protein expression. The higher viability of thymic DCs also enhanced their allostimulatory capacity. Taken together, the results suggest a new function of CXCL12 in the human thymus controlling the survival and functionality of thymic DCs.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

CXCL12 (stromal cell-derived factor 1/SDF-1) is a CXC chemokine constitutively expressed by most tissues, in contrast to the majority of the other chemokines that are usually induced by pro-inflammatory cytokines [1,2]. Two isoforms, SDF-1 α and SDF-1 β , are generated from the CXCL12/SDF-1 gene by alternative splicing, and SDF-1 α represents the predominant isoform [3,4]. CXCL12 was initially identified as a pre-B cell growth factor and was later demonstrated to play critical roles in organogenesis as well as homing/mobilization, survival, proliferation and activation of different types of normal and malignant cells [1,5–10]. CXCR4, the receptor for CXCL12, is a G-protein-coupled 7-transmembrane receptor that also functions as a coreceptor for the entry of T-tropic strains of human immunodeficiency virus 1 into CD4⁺ cells [11–13].

Accumulating evidence suggests that CXCL12 and its receptor CXCR4 may play an important role in intrathymic T-cell differentiation in both humans and mice: CXCL12 mRNA and protein

are abundantly expressed in fetal and adult thymus [14–19]; CXCR4 is highly expressed on intrathymic progenitor cells and to a lesser extent on immature CD4⁺ CD8[−] and CD4⁺ CD8⁺ thymocytes [15–17,20]; CXCL12 functions as a chemotactic factor to direct the migration of early thymic precursor cells from the cortico-medullary border to the cortex [16], as well as the movement of immature CD4⁺ CD8⁺ through the thymic cortical area [21], and also functions as a fugetactic factor to regulate mature thymocyte emigration to periphery [22,23]; CXCL12/CXCR4 signaling is required for the survival of human CD34⁺ intrathymic precursor cells and partially mediates the effects of IL-7 on the expansion and differentiation of human early thymocytes [15]; the blockade of CXCL12/CXCR4 signaling pathway, using different mutant and chimeric mice, results in reduced numbers of thymocytes and an arrest in thymocyte maturation [16,24–26]. However, nothing has been reported about a possible role for CXCL12/CXCR4 signaling in the function of thymic dendritic cells (DCs). Thymic DCs are professional antigen-presenting cells that are mostly located in the cortico-medullary border and the medulla [27,28]. Their main function is to present self-antigens and induce negative selection of potential auto-reactive T-cell clones [29,30]. We report in this study that thymic DCs express CXCR4 and produce CXCL12. In addition,

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3947166; fax: +34 91 3941396.
E-mail address: avicente@bio.ucm.es (A. Vicente).

Survival and function of human thymic dendritic cells are dependent on autocrine Hedgehog signaling

Alberto Varas,^{*,1} Carmen Hernández-López,^{*} Jaris Valencia,^{*} Silvia Mattavelli,[†] Victor G. Martínez,^{*} Laura Hidalgo,^{*} Cruz Gutiérrez-Frías,^{*} Agustín G. Zapata,[†] Rosa Sacedón,^{*} and Angeles Vicente^{*}

Department of Cell Biology, Faculties of ^{*}Medicine and [†]Biology, Complutense University, Madrid, Spain

Abstract: The Hedgehog (Hh) family of signaling molecules functions in the development of numerous tissues during embryogenesis and has also been involved in adult self-renewing tissues. Recent results have demonstrated that the different components of the Hh signaling pathway are expressed in the human thymus. In this study, we investigate whether thymic dendritic cells (DCs) are cell targets for Hh signaling. Both components of the Hh receptor, Patched and Smoothened, as well as other Hh-binding proteins with modulating functions, are expressed by human thymic DCs. The expression of Gli1, Gli2, and Gli3 transcription factors suggests that the Hh signaling pathway is active in thymic DCs, and approximately one-half of thymic DCs produces Sonic Hh (Shh). The culture of thymic DCs with Shh protects them from apoptosis [similarly to CD40 ligand (CD40L)], and these antiapoptotic effects are related to an up-regulation of Bcl-2 and Bcl-X_L protein expression. The addition of the Hh pathway inhibitor, cyclopamine, decreases DC viability and impairs their allostimulatory function in vitro. In addition, the blockade of the Hh signaling pathway by cyclopamine treatment abrogates the up-regulation of HLA-DR, CD86, CD80, and CD83 expression induced by CD40L on thymic DCs. Finally, we also show that after activation with CD40L thymic DCs down-regulate the expression of Hh receptor components as well as Shh production. Taken together, these results suggest that the survival and function of thymic DCs are regulated by an autocrine Hh signaling. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1476–1483; 2008.

Key Words: thymus · cyclopamine · Patched · Smoothened

INTRODUCTION

The Hedgehog (Hh) signaling pathway plays critical roles in vertebrate and invertebrate embryogenesis, determining cell fate and patterning during the development of many organs, as well as regulating survival and proliferation of a number of different cell types [1, 2]. The importance of this pathway is emphasized by the fact that mutations leading to an aberrant

Hh pathway can result in severe developmental defects and cancers in humans [3–6]. In mammals, three proteins have been described to compose the Hh family: Sonic (Shh), Indian (Ihh), and Desert Hh (Dhh), and Shh is the best studied [1, 7]. Hh proteins undergo extensive post-translational modifications before being secreted, and Hh signaling is initiated by binding of Hh proteins to the 12-span transmembrane receptor Patched (Ptc), which in the absence of ligand, represses signaling by inhibiting the seven-transmembrane protein Smoothened (Smo). Upon ligand binding, the repressive activity of Ptc is abrogated, allowing Smo to transduce the signal toward the nucleus by a complex mechanism [7–9]. At the end of the Hh signaling pathway are the members of the Gli family of transcription factors, Gli1, Gli2, and Gli3. The specific functions of the Gli proteins are still poorly understood, although all of the activities demonstrated for Gli1 are positive, whereas Gli2 and Gli3 mainly function as positive and negative transcriptional regulators, respectively [10–12].

The different components of the Hh signaling pathway have been described to be expressed in the thymus [13–15] and to play an important role regulating the proliferation and differentiation of thymocyte precursors [13, 14, 16–19]. In humans, the three mammalian Hh proteins are produced by thymic epithelial cells. Shh-producing epithelial cells are restricted to the thymic subcapsula and medulla, and Ihh- and Dhh-expressing epithelial cells appear distributed throughout the thymic parenchyma. The requisite Hh receptors, Ptc and Smo, are expressed mainly by immature thymocytes and also by thymic epithelial cells located in the cortex and medulla. The Gli transcription factors are differentially expressed by the different thymic cell subpopulations [15]. The culture of CD34⁺ T cell precursors in the presence of recombinant Shh protein induces their survival. It also inhibits their IL-7-mediated proliferation and differentiation by down-regulating CD127/IL-7R expression and inhibiting IL-7-dependent STAT5 phosphorylation, indicating that Shh contributes to maintain the intrathymic progenitor cell population [17]. How-

¹ Correspondence: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Avda. Complutense s/n, Ciudad Universitaria, Complutense University, 28040 Madrid, Spain. E-mail: avaras@bio.ucm.es

Received November 26, 2007; revised January 24, 2008; accepted February 13, 2008.

doi: 10.1189/jlb.1107792